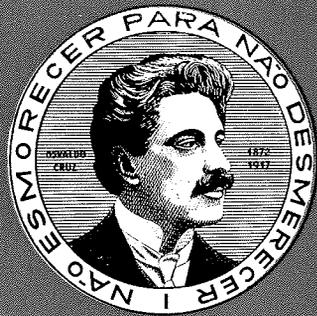


Vol. 1, n.º 2, p. 61-109
1970

REVISTA
DE
MICROBIOLOGIA



Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

B-D **Mérieux** Reativos para Laboratórios

REATIVOS PARA BIOQUÍMICA

Amilase-Kit — Urea-Kit
Fosfatases ácidas e alcalinas
Reativos para Transaminases
Desidrogenases lácticas
Gluco-Kit — Uricacid-Kit
Amônia-Kit — Clor-Kit

REATIVOS PARA COAGULAÇÃO

Tromboplastina cálcica
Plasma normal testemunha

SOROS DE CONTRÔLE

Hemo-Trol — Icto-Trol
Lyo-Trol — Zimo-Trol
Mono-Trol — Stea-Trol

REATIVOS PARA SOROLOGIA

Prova do latex em lâmina
Prova do latex em tubo
Estreptolisina "O"
Sôro anti-proteína C
Antígeno brucélico
Complemento sêco
Sôro diagnóstico da rubéola
Mononucleose — Kit

Imunofluorescência

Isotiocianato de fluoresceína
Globulina anti-humana marcada
Suspensão *Treponema pallidum*
Antígeno Toxoplásmico com
testemunho positivo
Tampão P.B.S.



Baltimore Biological Laboratory

MEIOS DE CULTURA DESIDRATADOS REAGENTES

ANTÍGENOS — SOROS

PEPTONAS E INGREDIENTES — DIVERSOS

APARELHOS CIENTÍFICOS

JARRA PARA ANAERÓBIOS GASPAK

BIOLAB

PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

Rio de Janeiro — GB: Rua Rezende, 96 A — Tel.: 221-4651 — 221-4089

São Paulo: Av. Cásper Líbero, 58 — Sala 1603 — Tel.: 35-2691

DISTRIBUIDORES EXCLUSIVOS

REVISTA DE MICROBIOLOGIA



EDITORES

ITALO SUASSUNA

LUIZ R. TRABULSI

EDITORES ASSOCIADOS

ELFRIED KIRCHNER
MARIA ELISA ZULIANI

FLÁVIO ALTERTHUM
RAUL DIAS DOS SANTOS

Secretária-Redatora — HERCY DE SOUZA VALLE

CONSELHO CIENTIFICO (1970-1972)

AMADEU CURY
AUGUSTO E. TAUNAY
A. MONTEIRO FILHO
CARLOS DA SILVA LACAZ
CIRO A. PELUFFO
DÁCIO A. CHRISTOVÃO
DIRCE FRANCO DE ARAUJO
EDUARDO O. CISALPINO
GOBERT DE ARAUJO COSTA
HOMERO S. JOBIN
JANDIRA PLANET DO AMARAL
JOÃO XAVIER VIANA
JOSÉ OLIVEIRA DE ALMEIDA
JOSÉ NORONHA PERES
LÚCIO P. DE CARVALHO LIMA
LUIZ SIQUEIRA CARNEIRO
MILTON FONTES MAGARÃO
OSWALDO G. DE LIMA
OTÁVIO BARACHINI
OTTO G. BIER
PAULO DE GÓES
RAYMUNDO A. C. MONIZ DE ARAGÃO
SEYMOR H. HUTNER

CONSELHO REDATORIAL (1970-1971)

ADHEMAR PURCHIO
ANITA DOLLY PANEK
ANTÔNIO F. PESTANA DE CASTRO
CARLOS A. SANTA ROSA
CID V. FRANCO DE GODOY
ERNEY P. CAMARGO
HEBE LABARTHE MARTELLI
IRACEMA PINHEIRO
IVONE R. SUASSUNA
JOHANNA DOBEREINER
JOSÉ ANTONIO SERRANO
LAERTE M. DE ANDRADE
LÉA CAMILLO-COURA
LUIZ RODOLPHO TRAVASSOS
NEWTON NEVES DA SILVA
OCTÁVIO A. DE CARVALHO PEREIRA
OLGA FISCHMAN GOMPERTZ
OSMANE HIPÓLITO
PAULO S. MINAMI
SÉRGIO O. PINTO COSTA
SYLVIO BEVILACQUA
TOMOKO HIGUCHI
WALTER BORZANI
WALTER COLLI
WILSON CHAGAS DE ARAUJO
WLADIMIR LOBATO PARAENSE

Rev. Microbiol.	Vol. 1	N.º 2	Pág. 61 - 109	Outubro / Dezembro, 1970
-----------------	--------	-------	---------------	--------------------------

C O N T E Ú D O

ARTIGOS ORIGINAIS	Pág.
Ergosterol biosynthesis in psychrophobic yeasts — M. E. de LIMA, J. ANGLUSTER & L. R. TRAVASSOS	61
Resistance to nine drugs of <i>Shigella</i> strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968 — L. R. TRABULSI, M. E. ZULIANI & M. R. F. de TOLEDO	71
<i>Elytrosporangium spirale</i> : Nova espécie de <i>Actinoplanaceae</i> do gênero <i>Elytrosporangium</i> — J. O. F. de MORAIS	79
Complement fixation test in evaluation of immunity against rabies — O. A. de C. PEREIRA, T. RAPHAELIAN & N. COUTINHO	85
NOTAS	
Growth factors for <i>Crithidia fasciculata</i> above 33°C — I. ROITMAN	93
Isolation of three new serotypes of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> — A. F. P. de CASTRO, L. R. TRABULSI, O. CAMPEDELLI Filho & C. TROISE	95
MÉTODOS DE LABORATÓRIO	
Diagnóstico laboratorial das leptospiroses — C. A. SANTA ROSA	97

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

Sócios Patrocinadores

BIOLAB — PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

CELM — COMPANHIA EQUIPADORA DE LABORATÓRIOS MODERNOS

ELI LILLY DO BRASIL LTDA.

INDÚSTRIAS FARMACÉUTICAS FONTOURA WYETH S. A.

INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÉUTICA SCHERING S. A.

LABORTERAPICA BRISTOL S. A. INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÉUTICA

LABORATÓRIO ROCHE — PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÉUTICOS

LAFI — PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÉUTICOS

MICRONAL S. A. — APARELHOS DE PRECISAO

PFIZER QUÍMICA LTDA.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista de Microbiologia* é uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia. Publica trabalhos originais em todos os campos da Microbiologia e da Protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do corpo editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e cópia) a L. R. Trubalsi, Escola Paulista de Medicina, rua Botucatu, 720, Caixa Postal 7144, São Paulo, S.P., Brasil ou a Ítalo Suassuna, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pasteur 250, fundos, Rio de Janeiro, GB, Brasil.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito apresentado à *Revista* deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os manuscritos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Uma vez aceitos pela *Revista* não poderão ser reproduzidos, mesmo em parte, sem consentimento oficial dos editores.

O estilo editorial da *Revista* segue essencialmente o *Style Manual for Biological Journals* (2.^a ed., AIBS, 1964). Os símbolos genéticos deverão seguir essencialmente as recomendações de DEMEREC et al. (*Genetics* 54:61, 1966). Abreviaturas bioquímicas devem seguir essencialmente as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.* 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (*Enzyme Nomenclature*, Elsevier Publishing Co., 1965). Para expressar comprimentos, pêsos e volumes, os prefixos nano (n) e pico (p) devem ser usados em lugar de milimicro (m μ) e micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em nanômetros (nm; 10⁻⁹ m) ou em micrômetros (μ m; 10⁻⁶ m), ou ainda, em Angstroms (Å; 10⁻¹⁰ m). Partes por milhão (ppm), devem ser expressas como microgramas por mililitro (μ g/ml), ou microlitros por litro (μ litros/litro). A *Revista* se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DOS MICRORGANISMOS — A combinação binária, nome do gênero seguido do nome da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7.^a ed., 1957) obedecida. Se um Autor divergir dessa nomenclatura, seu próprio julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente do Manual de Bergey deve ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um novo nome for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os manuscritos devem ser datilografados em papel branco comum, tipo ofício, em espaço duplo ou triplo, com margens laterais, superior e inferior de, no mínimo, 3 centímetros. Devem, ainda, ser divididos nas seguintes seções: Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências bibliográficas.

RESUMO — Todo trabalho deve se iniciar com um resumo que não deve exceder a 250 palavras. Além destes, os redigidos em inglês devem ser acompanhados de um resumo em português e os redigidos em português e espanhol de um resumo em inglês. Estes resumos devem incluir o título do trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências são citadas por número. A seção de Referências Bibliográficas deverá ser apresentada em ordem alfabética, pelo primeiro Autor, e numerada. Os nomes das publicações científicas são abreviados de conformidade com a lista de periódicos resumida pelos *Chemical Abstracts*. Citações de resumos, teses, "dados não publicados", "comunicações pessoais" e "no prelo", não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Cada tabela deve ser datilografada numa página separada. Os dados devem ser arranjados de maneira a que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Os cabeçalhos devem ser suficientemente claros de maneira a que os dados sejam compreensíveis sem necessidade de consulta ao texto. Notas explanativas de rodapé são permitidas, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados na obtenção dos dados relatados devem ser mencionados exclusivamente na seção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Um conjunto completo de figuras, preferivelmente como fotografias, deve acompanhar cada uma das duas vias do manuscrito. Os gráficos devem ser desenhos concluídos e que não requeiram qualquer montagem ou re-arranjo. Parte alguma de um gráfico poderá ser datilografada (exceto a legenda, que deve constar em página separada). Todas as legendas devem ser feitas com um e o mesmo normógrafo. A maioria dos gráficos será reduzida à largura de cerca de 13 centímetros e todos os elementos no desenho devem ser previstos para essa escala de redução. A legenda da figura deve proporcionar informação suficiente para que a figura seja compreensível sem consulta ao texto. Detalhes experimentais não devem ser repetidos nas legendas das figuras.

NOTAS PRÉVIAS — Não devem exceder de 500 palavras e o respectivo resumo, de 25 palavras. Os Autores devem consultar um número da *Revista* para se familiarizarem com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Os autores terão direito a 10 separatas, devendo entrar em entendimento com os Editores da *Revista* quando desejarem maior número, correndo então as despesas por conta dos mesmos.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

AQUISIÇÃO POR NÃO-MEMBROS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

A Revista de Microbiologia é órgão da Sociedade Brasileira de Microbiologia, sendo publicada trimestralmente. Teve início em julho-setembro de 1970.

PREÇOS

Cada exemplar	Cr\$ 10,00
Número atrasado	Cr\$ 15,00
Assinatura anual	Cr\$ 40,00
Assinatura para o Exterior Marítimo	US\$ 10,00
Assinatura para o Exterior Aéreo	US\$ 15,00

Ordens de pagamento e requisição de números atrasados deverão ser feitas para:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

Escola Paulista de Medicina

Rua Botucatu, 720

Departamento de Microbiologia e Parasitologia

SÃO PAULO — BRASIL

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

SUBSCRIPTION BY NON-MEMBERS OF THE SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

The Revista de Microbiologia is a quarterly publication, sponsored by the Sociedade Brasileira de Microbiologia. Its first number was published on July-September, 1970.

PRICES

Single copies	Cr\$ 10,00
Back copies	Cr\$ 15,00
Annual subscription	Cr\$ 40,00
Foreign countries subscription (Second class postage)	US\$ 10,00
Foreign countries subscription (Air mail)	US\$ 15,00

Orders and enquiries about back volumes should be sent to:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA

Escola Paulista de Medicina

Rua Botucatu, 720

Departamento de Microbiologia e Parasitologia

SÃO PAULO — BRASIL

ERGOSTEROL BIOSYNTHESIS IN PSYCHROPHOBIC YEASTS

M. E. de LIMA, J. ANGLUSTER and L. R. TRAVASSOS (1, 2)

S U M M A R Y

Incorporation of $^{14}\text{CH}_3$ -labelled methionine was used to monitor synthesis of ergosterol in psychrophobic yeasts of the species *Candida slooffii*, *Torulopsis pintolopesii*, *Torulopsis (Candida) bovina*, and *Saccharomyces telluris*. Two more yeasts were studied for comparison — *Torulopsis glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Sterol synthesis was determined at the extremes of the growth range — 25-28°C and 40-43°C — as well as at the optimum temperature for each strain. Highest sterol synthesis was in aerated cells previously grown in stationary cultures rather than with forced aeration. Most strains grew very poorly in anaerobiosis. Sterol synthesis as a rule was higher at the lower temperatures, being inhibited as the temperature was raised irrespective of the optimum for each strain.

Three different procedures were used for sterol recovery from whole yeast cells. The best yield was obtained with cold acid (30°C) treatment prior to saponification in KOH 20% at 100°C. A dual physiological form of ergosterol which is acid labile could not be detected in the strains studied. Only ergosterol was characterized in the extracts by thin-layer chromatography and U.V. spectroscopy.

I N T R O D U C T I O N

The influence of temperature on the biosynthesis of ergosterol in yeasts was studied by STARR & PARKS¹⁹. Maximal yield in *Saccharomyces cerevisiae* was obtained when yeast cells were incubated at temperatures near the optimal temperature of growth — 30°C. A 35°C sterol synthesis was depressed and markedly inhibited at 40°C and above. Complete lysis of cells occurred at 45-50°C.

S. cerevisiae able to synthesize ergosterol in aerated cultures need an association of ergosterol and fatty acids for anaerobic growth^{3, 4}. The specificity of the fatty acid requirement was studied by LIGHT et al.¹¹ and that of ergosterol by PROUDLOCK et al.¹⁵.

At 40°C, cultures of *S. cerevisiae* die in a rate similar to that observed in bacteria by thymine deprivation. This could be abolished by supplementing yeast extract and oleic acid¹⁷. STARR & PARKS¹⁹ identified ergosterol besides oleic acid as the indispensable

factor for growing *S. cerevisiae* at 40°C in anaerobiosis. The coincidence of nutritional requirements in anaerobiosis and at high temperatures is noteworthy. SHERMAN¹⁸ observed the induction of petites as an important temperature effect.

Psychrophobic yeasts have a high minimum temperature being saprophytes of warm-blooded animals⁶. Since these yeasts are somewhat specific for their hosts and are not usually found outside the animal body, the study of the physiology of synthesis of essential metabolites may contribute to the understanding of these ecological constraints.

In the present paper we studied the synthesis of ergosterol at different temperatures in psychrophobic yeasts — *Candida slooffii*, *Torulopsis pintolopesii*, *Torulopsis bovina*, *Saccharomyces telluris* — and in strains of *Torulopsis glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae* for comparison.

(1) Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, GB, Brasil

(2) Fellow of the Conselho Nacional de Pesquisas (Brasil)

MATERIAL AND METHODS

Strains — The following strains were used: *Candida slooffii* 2419 from the Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS); *Candida slooffii* 2689 received from L. do Carmo Sousa, Inst. Gulbenkian de Ciência, IGC, Oeiras, Portugal; *Candida slooffii* 71/811E from N. van Uden (IGC); *Torulopsis pintolopesii* 2616 from L. do Carmo Sousa, originally from CBS; *Torulopsis pintolopesii* 2405 from N. van Uden (IGC); *Torulopsis (Candida) bovina* 2760 from the CBS; *Torulopsis bovina* 2760T₁, a carnitine-less mutant isolated by TRAVASSOS et al.²⁰; *Torulopsis glabrata* isolated from human gastric juice by J. Angluster and M. E. Lima, Instituto de Microbiologia, UFRJ; *Saccharomyces teluris* from L. do Carmo Sousa (IGC); *Saccharomyces cerevisiae* 188 from the Fleischman Labs. Strains were maintained according to CURY et al.⁸.

Chemicals — The following substances and solvents were used: ergosterol, Aldrich Chem. Comp.; DL-methionine, California Corp. Biochem. Res.; L-methionine-Me-¹⁴C, New England Nuc. Corp. (specific activity 13.2 mCi/m-mole); 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzene and diphenyloxazole, Sigma Chem. Comp.; toluene, E. Merck D.; petroleum ether (50-60°C) from the Centro de Pesquisas de Produtos Naturais, UFRJ.

Measure of radioactivity — Radioactivity was measured in a Packard Tri-Carb Liquid Spectrometer. Solution used was: Diphenyloxazole 4 to 5 g, 1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyloxazolyl)benzene 0.1 g, toluene 1000 ml.

Incorporation of methionine-Me¹⁴C — Yeast cells were grown in a medium with the following composition: peptone (Difco) 1%, yeast extract (Difco) 0.5%, glucose 2%, agar 1.5%; pH 6.5. The medium was dispensed in 1 liter volumes into 2 liter flasks. Flasks were incubated at 37°C for 48 hours, without shaking. For *S. cerevisiae* incubation was made at 30°C. For inocula cells from 24 hours slants were resuspended in 5 ml sterile saline and transferred to the 2 liter flasks. Grown cells were harvested and washed 4 times with phosphate buffer (0.1 M), pH 6.0. Washed yeasts were suspended in the phosphate buffer + glucose 2%. Incubation was done for 2 hours at the temperatures indicated in the tables. After 2 hours DL-methionine 10 mg% + L-methionine-Me-¹⁴C 0.02 mCi% were added and incubation was prolonged

for 5 hours. Cell suspensions (final volume 5 ml) were dispensed in 50 ml flasks and shaken at 136 rpm. After incubation, the volumes were adjusted to 5 ml in all systems and aliquots taken for determination of cellular dry weight. For extraction of sterols, cells were harvested and washed thrice in distilled water.

Extraction of ergosterol-¹⁴C — Three procedures were used:

1) Routine saponification — Washed cells were suspended in distilled water plus equal volume of KOH 40%; the flasks were covered with aluminum foil and heated at 100°C for 6 hours.

2) Hot acid treatment — Cells were suspended in distilled water plus equal volume of HCl 0.1N; flasks were heated at 100°C for 1 hour, cooled, and alkalinized with KOH 40% until pH 10.

3) Cold acid treatment and saponification — Cells were suspended in distilled water plus equal volume of HCl 0.1N; flasks were incubated at 30°C for 1 hour; the supernatant was discarded and the residue collected and saponified with KOH 20% at 100°C for 6 hours as in 1.

Aliquots (0.5 ml) of the saponified materials were taken and extracted with petroleum ether until no more radioactivity was extracted. To determine radioactivity extracts were dried at 70°C under nitrogen. The final residue was taken in a known volume of petroleum ether and aliquots added directly into the scintillation solution.

Anaerobic growth — Brewer anaerobic jars were used. Air was substituted by a mixture of nitrogen 95% + CO₂ 5%. Yeasts were incubated for 96 hours at 37°C.

Thin-layer chromatography — It was made in plates coated with 50 g silica gel G (Merck) in 110 ml distilled water. Plates were dried and, before spotting the material, activated at 100°C for 10 minutes. Solvent: benzene:ethyl acetate (5:1). Spots were located with anisaldehyde 1 g, acetic acid 100 ml, conc. sulphuric acid 2 ml.

RESULTS

While presenting the results, several aspects concerning experimental conditions need to be discussed:

Time of incubation with methionine-Me-¹⁴C — This time was fixed to 5 hours in our experiments. The same time of incubation was used by ADAMS & PARKS¹ who found high levels of hot acid-extractable ergosterol (or ergosteryl palmitate) in *S. cerevisiae*. By routine saponification however, the highest yield of ergosterol was only obtained after 8 hours of incubation. In *Candida slooffii* (strain 2419) synthesis of base and acid-labile ergosterol was maximal after 5 hours (Fig. 1).

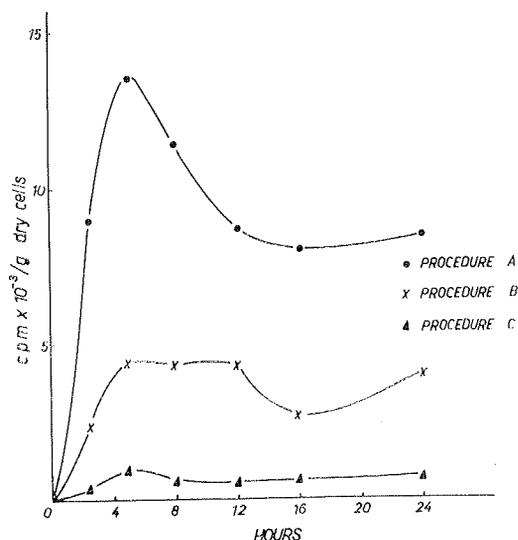


Fig. 1 — Time course analysis of sterol synthesis in *Candida slooffii*. Procedures: A — Cold acid and saponification; B — Routine saponification; C — Hot acid treatment. (For details see Material and Methods).

Temperature of incubation — The following temperatures were chosen: a) 37°C for all strains; b) maximal growth temperatures for psychrophobic yeasts — 43°C for *C. slooffii*, *T. bovina* and *S. telluris*; 40°C for *T. pintolopesii*; for *S. cerevisiae* and *T. glabrata* we used 43°C and 44°C, although these temperatures are not maximal for growing these yeasts; c) temperatures lower than 37°C — 25°C for *T. bovina* and *T. glabrata*; 28°C for *C. slooffii*, *T. pintolopesii*, *S. telluris* and *S. cerevisiae*. With the choice of these temperatures we intended to compare sterol synthesis at the extremes of the growth range as well as at temperature near the optimal one for most strains.

Carbon source — Results reported by ADAMS & PARKS¹ suggest differences in sterol synthesis when the carbon source was glucose or galactose. Since psychrophobic yeasts will only utilize glucose in growth

experiments⁸, we never used galactose as a carbon substrate.

Conditions for growing the yeasts (aerobiosis and anaerobiosis) — The relationship of biosynthesis of mitochondria (or chondrioids) and ergosterol synthesis, discussed by several Authors^{12, 13}, would suggest that aerated, anaerobically grown cells are prone to synthesize higher amounts of ergosterol than aerobically grown cells. This was actually true in *S. cerevisiae*¹⁰. Growth of most of the psychrophobic yeasts was very poor in anaerobiosis with the exception of a few strains. One of these, *C. slooffii* 2419, synthesized much more ergosterol when grown previously in aerobic stationary culture than when in anaerobiosis (Table I). Forced aeration of the culture did not also predispose *C. slooffii* to increased synthesis of ergosterol, when cells were incubated afterwards with methionine. At 37°C and 43°C however, and depending on the extraction procedure used, some values for sterol synthesis by cells grown with vigorous shaking were higher than those by cells grown in stationary culture. Since the highest yield at 28°C was obtained with cells from stationary cultures, this was the general procedure for growing other psychrophobic yeasts.

Extraction procedures — The three procedures used were selected from those tested by ADAMS & PARKS¹. The three procedures gave the best yields in *S. cerevisiae* and hot acid hydrolysis could eventually liberate a second physiological form of ergosterol.

Results obtained in the present paper are represented in Tables II, III and IV. Sterol synthesis differs greatly from strain to strain. No definite separation of species can be made on this basis. Highest levels of ergosterol were found in *T. glabrata* and *S. cerevisiae*. Rise in temperature was always followed by lowering capacity of sterol synthesis (Table II). *C. slooffii* at its minimal growth temperature will synthesize about 4 to 10 times more ergosterol than at 37°C and 43°C, temperatures nearer the optimal — 42°C⁸. Sterol levels recovered after hot acid treatment were very low in all yeasts including *S. cerevisiae*. The highest concentration was detected in *T. glabrata* (Table III). Ergosterol levels recovered in the third extraction procedure — cold acid + saponification with KOH 20% at 100°C — were generally higher than those in the other methods (Table IV). One strain of *T. pin-*

TABLE I

Incorporation of the radioactivity from methionine-Me-¹⁴C in the sterols of *C. slooffii* (strain 2419) grown in aerobiosis and anaerobiosis

Growth at 37°C with/in:	Extraction procedure	cpm × 10 ⁻² /g dry cells		
		28°C	37°C	43°C
Forced aeration (1)	Saponification	3.94	5.31	4.37
	Hot acid	0.23	0.42	1.26
	Cold acid and saponification	3.01	6.22	3.32
Stationary culture (2)	Saponification	12.95	3.30	1.36
	Hot acid	1.28	1.14	0.53
	Cold acid and saponification	13.38	13.11	3.60
Anaerobiosis (3)	Saponification	1.07	0.49	0.23
	Hot acid	0.16	0.21	0.18
	Cold acid and saponification	2.02	0.49	0.25

(1) A 3 l flask with 1 l glucose Sabouraud's medium shaken at 200 r.p.m.

(2) The same as (1) without shaking

(3) After Material and Methods

tolopesii and the strain of *T. glabrata* were exceptions. With the third extraction procedure rise in temperature stimulated synthesis of ergosterol in *T. glabrata* and inhibited that in all other yeasts. Lysis of cells in the glucose-phosphate solution was more prominent with yeasts of the genera *Candida* and *Torulopsis*. Strains of *Saccharomyces* — either *S. telluris* or *S. cerevisiae* — were more resistant to lysis at 37°C and 43°C (Table V). No viable-cell counts were done.

In all extracts from all strains the only sterol identified by thin-layer chromatography and U.V. spectroscopy was ergosterol. No evidence was obtained for an acid-labile form of ergosterol as characterized in *S. cerevisiae*¹. Condition of growth in aerobic stationary culture was however different from that used by ADAMS & PARKS¹. Strains studied were also different.

DISCUSSION

Psychrophobic yeasts might behave differently from a mesophile like *S. cerevisiae* at least in relation to the temperature effects on the synthesis of essential nutrillites. Since they are obligate saprophytes and have optimal temperatures for growth at 37°C and above, an activation of the whole metabolism — in particular sterol synthesis and building up of cell membranes — at these temperatures should be expected. Tempe-

rature determined death of *S. cerevisiae* at 40°C and lysis at 45-50°C¹⁹ was at least in part counteracted by ergosterol and oleic acid. This could suggest that the incapacity for growing at elevated temperatures denoted lack of endogenously formed ergosterol. Internal composition of lipids may well determine the temperature range for growing microorganisms⁷. Results with psychrophobic yeasts were in this respect unexpected. Highest sterol synthesis was observed at the lower temperatures tested, irrespective of the optimal temperatures of growth. Levels of ergosterol synthesized by *S. cerevisiae* were much higher than for *Candida* and *Torulopsis* species. *T. glabrata*, a doubtful obligate saprophyte²¹ whose minimal temperature is low², synthesized nevertheless ergosterol in a rate comparable to *S. cerevisiae*. The greater resistance to lysis exhibited by *S. cerevisiae* and *S. telluris* might be correlated with the diploid stage in their life cycles⁹. A higher synthesis of ergosterol at low temperatures may on the other hand indicate a higher integrity of the membranes in these conditions, as suggested for *Tetrahymena*¹⁶.

Upon extracting ergosterol from yeasts we confirmed the results of ADAMS & PARKS¹ that not all sterol is recovered by routine saponification. Best yields were always obtained with cold acid treatment prior to routine saponification. Since we could not

TABLE II
Incorporation of the radioactivity from methionine- $Me-^{14}C$ in the sterols extracted after routine saponification

Strains	cpm $\times 10^{-5}$ /g dry cells						
	25°C	28°C	37°C	40°C	43°C	44°C	
<i>Candida slooffii</i> — 2419	—	12.2 \pm 0.84 (11)	3.34 \pm 0.33 (11)	—	1.40 \pm 0.1 (11)	—	
<i>Candida slooffii</i> — 2689	—	1.69 \pm 0.22 (10)	0.48 \pm 0.05 (10)	—	0.41 \pm 0.06 (10)	—	
<i>Candida slooffii</i> — 71/811E	—	5.12 \pm 0.38 (10)	1.94 \pm 0.21 (12)	—	1.00 \pm 0.09 (10)	—	
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2405	—	11.7 \pm 0.88 (10)	6.98 \pm 0.51 (10)	1.52 \pm 0.20 (10)	—	—	
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2616	—	12.2 \pm 1.0 (10)	7.92 \pm 0.66 (10)	4.86 \pm 0.43 (10)	—	—	
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760	3.14 \pm 0.07 (10)	1.14 \pm 0.01 (12)	0.22 \pm 0.01 (12)	—	0.11 \pm 0.00 (12)	—	
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760T ₁	9.04 \pm 0.03 (10)	6.25 \pm 0.35 (10)	5.20 \pm 0.2 (12)	—	2.67 \pm 1.6 (10)	—	
<i>Torulopsis glabrata</i>	27.4 \pm 3.9 (10)	—	26.5 \pm 3.3 (10)	—	—	26.3 \pm 0.9 (10)	
<i>Saccharomyces telluris</i>	—	1.84 \pm 0.12 (10)	1.29 \pm 0.19 (10)	—	0.17 \pm 0.01 (12)	—	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	20.3 \pm 0.29 (10)	18.2 \pm 0.36 (10)	—	6.24 \pm 0.11 (10)	—	

TABLE III
Incorporation of the radioactivity from methionine-³⁵S in the sterols extracted after hydrolysis in hot acid

Strains	cpm × 10 ⁻⁵ /g dry cells						
	25°C	28°C	37°C	40°C	43°C	44°C	
<i>Candida slooffii</i> — 2419	—	1.27 ± 0.04 (10)	1.12 ± 0.05 (10)	—	0.53 ± 0.01 (10)	—	
<i>Candida slooffii</i> — 2689	—	0.48 ± 0.00 (10)	0.24 ± 0.00 (10)	—	0.15 ± 0.00 (10)	—	
<i>Candida slooffii</i> — 71/811E	—	0.65 ± 0.03 (10)	0.34 ± 0.00 (10)	—	0.28 ± 0.00 (11)	—	
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2405	—	0.36 ± 0.01 (10)	0.52 ± 0.00 (10)	0.22 ± 0.01 (10)	—	—	
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2616	—	0.18 ± 0.00 (10)	0.17 ± 0.00 (10)	0.17 ± 0.00 (10)	—	—	
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760	0.72 ± 0.05 (10)	0.10 ± 0.00 (10)	0.08 ± 0.04 (12)	—	0.07 ± 0.04 (12)	—	
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760T ₂	0.61 ± 0.02 (10)	0.22 ± 0.02 (10)	0.08 ± 0.07 (10)	—	0.08 ± 0.04 (10)	—	
<i>Torulopsis glabrata</i>	1.31 ± 0.05 (12)	—	2.48 ± 0.09 (12)	—	—	1.77 ± 0.09 (12)	
<i>Saccharomyces telluris</i>	—	0.18 ± 0.00 (10)	0.17 ± 0.00 (10)	—	0.10 ± 0.00 (10)	—	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	0.61 ± 0.01 (10)	0.11 ± 0.00 (10)	—	0.09 ± 0.00 (12)	—	

TABLE IV
Incorporation of the radioactivity from methionine-Me-¹⁴C in the sterols extracted after cold acid treatment and saponification

Strains	cpm × 10 ⁻³ /g dry cells						
	25°C	28°C	37°C	40°C	43°C	44°C	
<i>Candida stoffii</i> — 2419	—	13.9 ± 1.2 (10)	13.4 ± 1.0 (10)	—	3.84 ± 0.29 (10)	—	
<i>Candida stoffii</i> — 2689	—	1.79 ± 0.14 (11)	0.86 ± 0.02 (10)	—	0.60 ± 0.03 (12)	—	
<i>Candida stoffii</i> — 71/S11E	—	7.54 ± 0.16 (12)	3.22 ± 0.13 (12)	—	1.03 ± 0.09 (11)	—	
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2405	—	17.1 ± 0.46 (12)	10.2 ± 0.2 (12)	10.2 ± 0.14 (12)	—	—	
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2616	—	8.45 ± 0.28 (12)	7.75 ± 0.05 (12)	4.59 ± 0.4 (12)	—	—	
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760	3.26 ± 0.05 (10)	1.52 ± 0.06 (10)	0.29 ± 0.00 (10)	—	0.14 ± 0.00 (10)	—	
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760T ₁	12.2 ± 0.00 (10)	9.17 ± 0.45 (10)	5.51 ± 0.09 (10)	—	3.46 ± 0.1 (10)	—	
<i>Torulopsis glabrata</i>	14.3 ± 1.9 (12)	—	23.6 ± 0.9 (12)	—	—	26.6 ± 1.8 (12)	
<i>Saccharomyces telluris</i>	—	2.74 ± 0.25 (10)	2.28 ± 0.02 (12)	—	1.18 ± 0.15 (10)	—	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	21.3 ± 0.4 (10)	18.9 ± 0.6 (10)	—	7.08 ± 0.04 (10)	—	

TABLE V

Cellular lysis (%) during aerated incubation with methionine in glucose-phosphate solution (*)

Strains	25°C	28°C	37°C	40°C	43°C	44°C
<i>Candida slooffii</i> — 2419	—	27.67	29.64	—	34.42	—
<i>Candida slooffii</i> — 2689	—	24.80	26.24	—	32.22	—
<i>Candida slooffii</i> — 71/811E	—	31.56	34.84	—	41.19	—
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2616	—	43.01	44.50	44.96	—	—
<i>Torulopsis pintolopesii</i> — 2405	—	31.72	32.02	34.75	—	—
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760	22.12	19.05	20.84	—	26.91	—
<i>Torulopsis bovina</i> — 2760T ₁	22.61	22.10	27.13	—	32.04	—
<i>Torulopsis glabrata</i>	22.21	—	30.00	—	—	37.24
<i>Saccharomyces telluris</i>	—	10.91	13.40	—	11.06	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	—	12.18	14.24	—	18.85	—

(*) Lysis is determined by subtracting the dry cellular weight at the end from that at the beginning of the incubation.

detect a dual physiological form of ergosterol which is acid labile, the differences in the yields by the two procedures may be attributed to the morphology of the yeast surface. They could be due to the presence of polysaccharides insoluble in alkali — insolubility of glucan in alkali is prominent in intact cells. This insolubility is hard to conform with the high branched structure of the polysaccharide¹⁴, so BACON et al.⁵ proposed that an insoluble membrane of chitin and other components would hinder extraction of glucan and glycogen from whole cells. Ultra-sonic treatment or mild acid conditions increased permeability of this membrane. The combination of cold acid and hot alkali treatment used by us might eventually favour solubility of surface polymers and hence lipid extraction.

RESUMO

Biossíntese de ergosterol em leveduras psicrófóbicas

Foi estudada a síntese de esteróis em leveduras psicrófóbicas, medida pela incorporação do grupamento metila de metionina-Me-¹⁴C na fração não saponificável extraída com éter de petróleo. As leveduras estudadas pertenciam às espécies: *Candida slooffii*, *Torulopsis pintolopesii*, *Torulopsis (Candida) bovina* e *Saccharomyces telluris*. Para

efeito de comparação foram estudadas igualmente 1 amostra de *Torulopsis glabrata* e 1 de *Saccharomyces cerevisiae*. As temperaturas empregadas para a incubação em presença de metionina, das células não proliferantes, foram selecionadas tendo em vista o mínimo, ótimo e máximo térmicos para o crescimento de cada espécie.

Nas condições empregadas, a síntese de esteróis era marcadamente deprimida com o aumento da temperatura, mesmo quando a temperatura ótima de crescimento estava próxima da temperatura máxima. Não ocorreu, em todos os casos, uma relação definida entre síntese de esteróis e temperatura ótima. Ao contrário, a síntese era maior nas temperaturas mínimas de crescimento. Comparando os diferentes métodos de extração dos esteróis, foi observado que em todos os casos o processo de tratamento prévio com ácido a 30°C e posterior saponificação a quente, era mais eficiente. Determinando-se a síntese de esterol em *Candida slooffii* em função do tempo, não foi observada outra forma fisiológica do ergosterol extraível em ácido a quente e que fôsse predominante nas primeiras horas de incubação. Em todos os extratos etéreos obtidos após os diferentes tratamentos, e em tôdas as amostras, somente foi observada a presença do ergosterol identificado por cromatografia em camada fina e pelo espectro no ultra-violeta.

REFERENCES

1. ADAMS, B. G. & PARKS, L. W. — Evidence for dual physiological forms of ergosterol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **70**:161-168, 1967.
2. ALTMAN, P. L. & DITTMER, D. S. — *Environmental Biology. Federation of American Societies for Experimental Biology*. U.S.A., Bethesda, Maryland, 1966.
3. ANDREASEN, A. A. & STIER, T. J. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I — Ergosterol requirements for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **41**:23-36, 1953.
4. ANDREASEN, A. A. & STIER, T. J. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II — Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **43**:271-282, 1954.
5. BACON, J. S. D.; FARMER, V. C.; JONES, D. & TAYLOR, I. F. — The glucan components of the cell wall of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* considered in relation to its ultra-structure. *Biochem. J.*, **114**:557-567, 1969.
6. CARMO SOUZA, L. — Distribution of yeasts in nature. In A. H. Rose & J. S. Harrison, eds. *The Yeasts*. Vol. 1. London, Academic Press, 1969.
7. CHAPMAN, D. — The effect of heat on membranes and constituents. In A. H. Rose, ed. *Thermobiology*. London, Academic Press, 1967.
8. CURY, A.; SUASSUNA, E. N. & TRAVASSOS, L. R. — Studies on the nutrition of thermophilic yeasts. *Torulopsis pintolopesii*, *Candida slooffii*, *Candida bovina* and *Saccharomyces telluris*. *An. Microbiol.*, **8**:13-64, 1960.
9. FARRELL, J. & ROSE, A. H. — Temperature effects in micro-organisms. In A. H. Rose, ed. *Thermobiology*. London, Academic Press, 1967.
10. KLEIN, H. P.; EATON, N. R. & MURPHY, J. C. — Net synthesis of sterols in resting cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **13**:591-627, 1954.
11. LIGHT, R. J.; LENNARZ, W. J. & BLOCH, K. — The metabolism of hydroxystearic acids in yeast. *J. Biol. Chem.*, **237**:1793-1800, 1962.
12. LUKINS, H. B.; THAM, S.; WALLACE, P. G. & LINNANE, A. W. — Correlation of membrane bound succinate dehydrogenase with the occurrence of mitochondrial profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**:363-367, 1966.
13. MORPURGO, G.; SERLUPU-CRESCENZI, G.; TECCE, G.; VALENTE, F. & VENETTACCI, D. — Influence of ergosterol on the physiology and ultra-structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature (London)*, **201**:897-899, 1964.
14. NORTHCOTE, D. H. — The solvation of water vapour by yeast cell walls and other polysaccharides. *Biochim. Biophys. Acta*, **11**:471-475, 1953.
15. PROUDLOCK, J. W.; WHEELDON, L. W.; JOLLOU, D. J. & LINNANE, A. W. — Role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **152**:434-437, 1968.
16. REID, R.; COX, D.; BAKER, H. & FRANK, O. — Phytosterol and other lipids as survival factors for *Tetrahymena* at 0-5°C. *J. Protozool.*, **16**:231-235, 1969.
17. SHERMAN, F. — The effects of elevated temperatures on yeast. I — Nutrient requirements for growth in elevated temperatures. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **54**:29-35, 1959.
18. SHERMAN, F. — The effects of elevated temperatures on yeast. II — Induction of respiratory deficient mutants. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **54**:37-52, 1959.
19. STARR, P. R. & PARKS, L. W. — Effect of temperature on sterol metabolism in yeast. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**:107-110, 1962.
20. TRAVASSOS, L. R.; SUASSUNA, E. N.; CURY, A.; HAUSMANN, R. L. & MIRANDA, M. — A carnitine-less mutant of *Candida bovina*. *An. Microbiol.*, **9**:465-489, 1961.
21. VAN UDEN, N.; CARMO SOUSA, L. do & FARINHA, M. — On the intestinal yeast flora of horses, sheep, goats and swine. *J. Gen. Microbiol.*, **19**:435-445, 1958.

Recebido para publicação em novembro, 1970.

RESISTANCE TO NINE DRUGS OF *SHIGELLA* STRAINS ISOLATED IN SÃO PAULO BETWEEN 1963 AND 1968

Luiz R. TRABULSI⁽¹⁾, Maria Elisa ZULIANI⁽¹⁾
and Maria Regina Fernandes de TOLEDO⁽²⁾

S U M M A R Y

The resistance to sulfadiazine (Su), streptomycin (S), tetracyclin (T), chloramphenicol (C), kanamycin (K), helaciline (He), cephalotine (Ce), nalidixic acid (NA) and gentamycin (G) of 330 *Shigella* strains, isolated in São Paulo between 1963 and 1968, was determined quantitatively. Based on the resistance levels of the 330 strains, it was possible to characterize 2 different populations: one sensitive to each drug, the other resistant to each of the first 5 drugs. In general, the resistant populations increased during the 5 year-period, never exceeding, however, the sensitive populations, with the exception of the Su-resistant one which, since 1963, represented about 90% of the strains. The most frequently encountered types of resistant strains were Su, SuS, SUSTC, and SuSTCK. The number of the Su strains decreased, while the number of the SuSTCK strains increased progressively from 1963 on. The frequency of the others varied from year to year.

I N T R O D U C T I O N

Within the past years the drug-resistance of *Shigella* and other Gram-negative bacteria has been investigated extensively in various countries. The interest in the subject was stimulated by the ever increasing number of drug resistance strains and, above all, by the discovery of resistance transfer from one bacteria to another by cellular contact.

From the comparison of the results reported from various countries it is evident that not only the magnitude of the problem differs, but also that the drugs involved, the patterns and, in some cases, the evolution of resistance deviate^{3, 5, 6, 8}. Thus, detailed knowledge of the sensitivity of this important intestinal pathogen is of local and general interest.

The purpose of this paper, which complements a previous investigation¹⁰, is the study of the present state, the evolution and

the patterns of drug-resistance in *Shigella* cultures isolated in São Paulo.

M A T E R I A L A N D M E T H O D S

Shigella strains — a total of 330 *Shigella* strains, isolated in our laboratory or sent to us for identification between 1963 and 1968, was studied. Table I gives the subgroups to which the strains belonged and the number of strains studied each year. All strains were kept in nutrient agar tubes, stoppered with a paraffined cork and protected from light. The majority of the patients infected by these *Shigella* strains came from the Capital, while some stemmed from different areas of the State of São Paulo. At the time of the feces cultures, these patients suffered from diarrhea, but it was not known whether they had received antibiotics or not.

- (1) Present address: Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil
(2) Present address: Departamento de Microbiologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, São Paulo, Brasil

TABLE I

Subgroups, number and isolation year of the 330 *Shigella* strains studied

Strains	1963	1964	1965	1966	1967	1968	Without date	Total
<i>Shigella dysenteriae</i>	1	3	1	1	0	0	0	6
<i>Shigella flexneri</i>	47	34	51	41	32	44	25	274
<i>Shigella boydii</i>	0	1	0	1	0	0	0	2
<i>Shigella sonnei</i>	4	3	13	5	11	9	3	48
Total	52	41	65	48	43	53	28	330

Drugs — the following drugs were used: sulfadiazine — Su (A/S Synthetic); streptomycin — S (streptomycin sulfate, Fontoura Wyeth); tetracyclin — T (Tetracyclin chlorohydrate, Quimase S/A); chloramphenicol C (Lepetit); kanamycin — K (kanamycin sulfate, Laborterápica Bristol); hetaciline — He (potassium hetaciline, Laborterápica Bristol); cephalotine — Ce (Cephalotin, Lilly); nalidixic acid — NA (Winthrop); and gentamycin — G (Garamycin, Schering).

Resistance determination — the plate dilution method was used. For Su, nutrient agar (Lab-Lemco Agar-Oxoid), containing 5% hemolyzed horse blood, was used². For the other drugs, DST agar-base (Oxoid) was used. The concentration of Su, S, T, C and K varied from 1 to 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, while the concentration of He, Ce, NA and G varied from 1 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (expressed as base of the drug). He was dissolved in phosphate buffer, pH 8, Ce and NA in water containing NaOH 1N. G was dissolved in water and the others according to the methods of GROVES & RANDALL¹.

The inoculum was the quantity contained in a platinum loop of 2 mm diameter, taken from a broth culture (Lab-Lemco Broth Oxoid) of 18 hours, diluted 1:1000 with the same medium.

RESULTS

Table II gives the drug-resistance levels of the 330 *Shigella* strains. When the resistance levels are represented graphically (Fig. 1), two distinct populations are in evidence for Su, S, T, C and K, one sensitive, the other resistant. As to the other drugs, only a sensitive population was en-

countered (the example of the He-population is included in Fig. 1).

The minimum resistance levels of the sensitive population were lower than 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for all drugs. With reference to S, K and Ce, the maximum resistance levels were lower than 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. As to the resistant populations, the minimum resistance levels were equal or higher than 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for Su, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for K and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for S and C. It was not possible to establish maximum resistance levels for the sensitive populations or minimum resistance levels for the resistant populations to T. However, transfer experimentes (unpublished data) demonstrated that the strains resistant to 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more, transferred their resistance and thus, these levels would be lower than 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and higher than 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The maximum levels were equal or higher than 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for Su, S and K, and equal or higher than 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for T and C, however lower than 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

The average of the resistant populations is characterized by resistance levels equal or higher than 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for Su, between 50 and 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for S, between 50 and 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for T and C, and 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for K. Table III gives the maximum and minimum levels for the sensitive and resistant populations.

The number and the percentages of the strains within each population are shown in Table IV. The resistant populations were represented by 298 strains (90.30%) for Su; 148 (44.84%) for S; 92 (28.48%) for T; 59 (17.87%) for C; and 47 (14.24%) for K. Fig. 2 shows the variation of the two types of populations with known isolation dates between 1963 and 1966. For all drugs an increase of the populations, uniform or not, was noted. With

TABLE II
Resistance levels of 330 *Shigella* strains

Resistance level ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Su		S		T		C		K		He		Ce		NA		G	
	no.	%	no.	%	no.	%												
1000	298	88.74	1	0.30	0	0	0	0	34	20.60	—	—	—	—	—	—	—	—
500	2	0.60	13	3.93	0	0	0	0	11	3.33	—	—	—	—	—	—	—	—
200	1	0.30	40	11.81	15	4.54	14	4.24	1	0.30	—	—	—	—	—	—	—	—
100	2	0.60	44	13.03	35	10.60	28	8.48	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
50	0	0	42	12.72	32	9.69	13	3.93	1	0.30	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	10	3.03	2	0.60	3	0.90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	4	1.21	1	0.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	40	12.72	6	1.81	0	0	15	4.54	0	0	0	0	0	0	0	0
1	14	4.24	137	41.51	28	8.48	68	20.60	255	77.27	88	26.66	294	89.09	68	20.6	12	3.63
<1	18	5.45	3	0.90	208	63.03	203	61.51	13	3.93	242	73.33	24	7.27	282	70.4	318	96.4

Sulfadiazine (Su) — Streptomycin (S) — Tetracyclin (T) — Chloramphenicol (C) — Kanamycin (K)
— Hetaciline (He) — Cephalotone (Ce) — Nalidixic acid (NA) — Gentamycin (G)

TABLE III
Resistance levels of the sensitive and resistant populations among the 330 *Shigella* strains studied

Drug	Sensitive Level ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			Resistant Level ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	Minimum	Maximum	Mean	Minimum	Maximum	Mean
Sulfadiazine	<1	<5	>1000	>1000	>1000	>1000
Streptomycin	<1	<10	50-500	>1000	>1000	50-500
Tetracyclin	<1	<5	50-200	200-500	200-500	50-200
Chloramphenicol	<1	<5	50-200	200-500	200-500	50-200
Kanamycin	<1	<10	100-500	>1000	>1000	100-500
Hetaciline	<1	<5	—	—	—	—
Cephalotone	<1	<10	—	—	—	—
Gentamycin	<1	<5	—	—	—	—
Nalidixic acid	<1	<5	—	—	—	—

TABLE IV
Sensitive and resistant populations among the 330 *Shigella* strains studied

Drug	Sensitive		Resistant	
	no.	%	no.	%
Sulfadiazine	32	9.70	298	90.30
Streptomycin	182	55.16	148	44.84
Tetracyclin	236	71.52	92	28.48
Chloramphenicol	271	82.13	59	17.87
Kanamycin	283	85.76	47	14.24
Hetaciline	330	100.00	0	0
Cephalotone	330	100.00	0	0
Nalidixic acid	330	100.00	0	0
Gentamycin	330	100.00	0	0

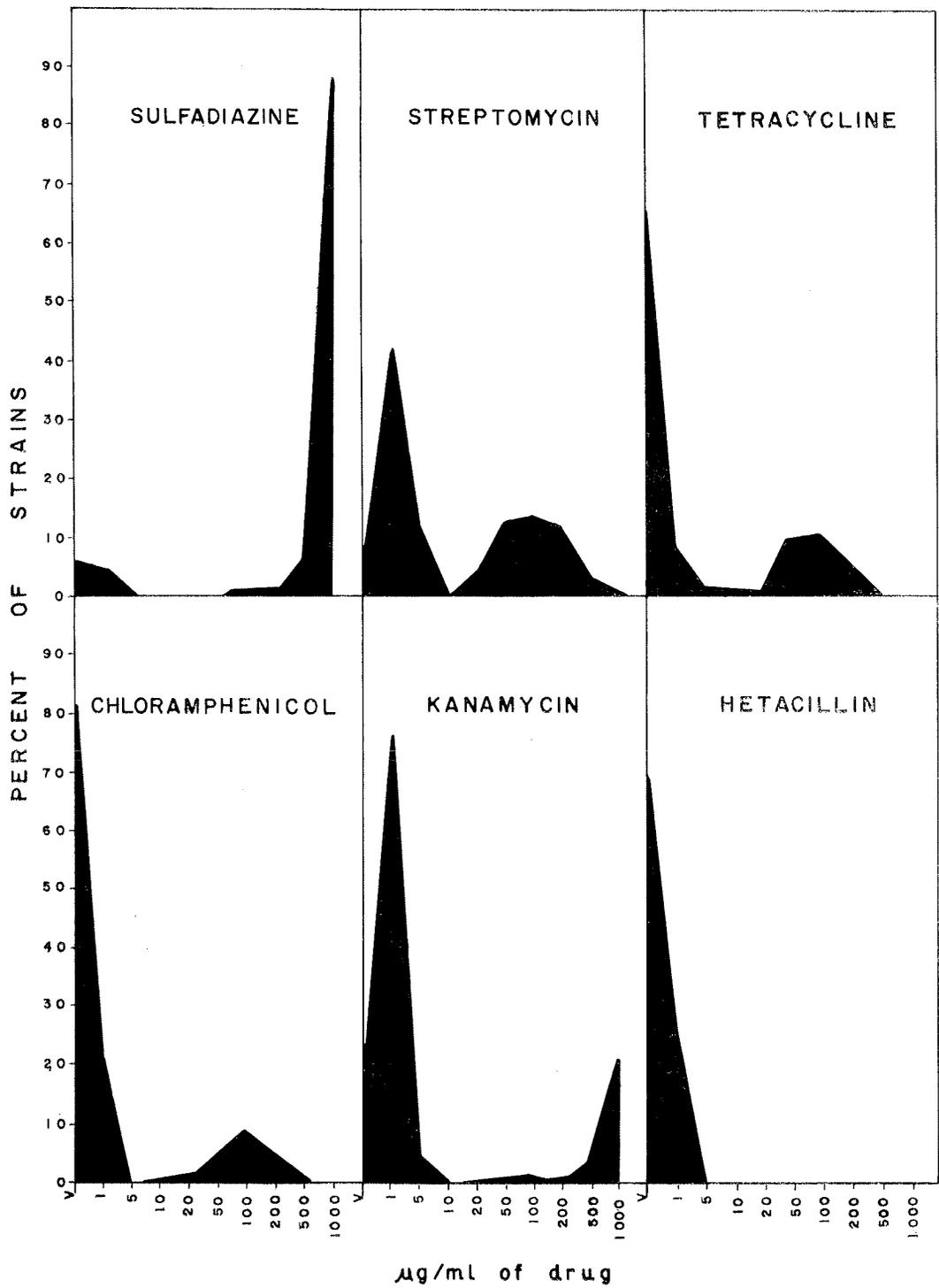


Fig. 1 — Distribution of the resistance levels of the 330 *Shigella* strains.

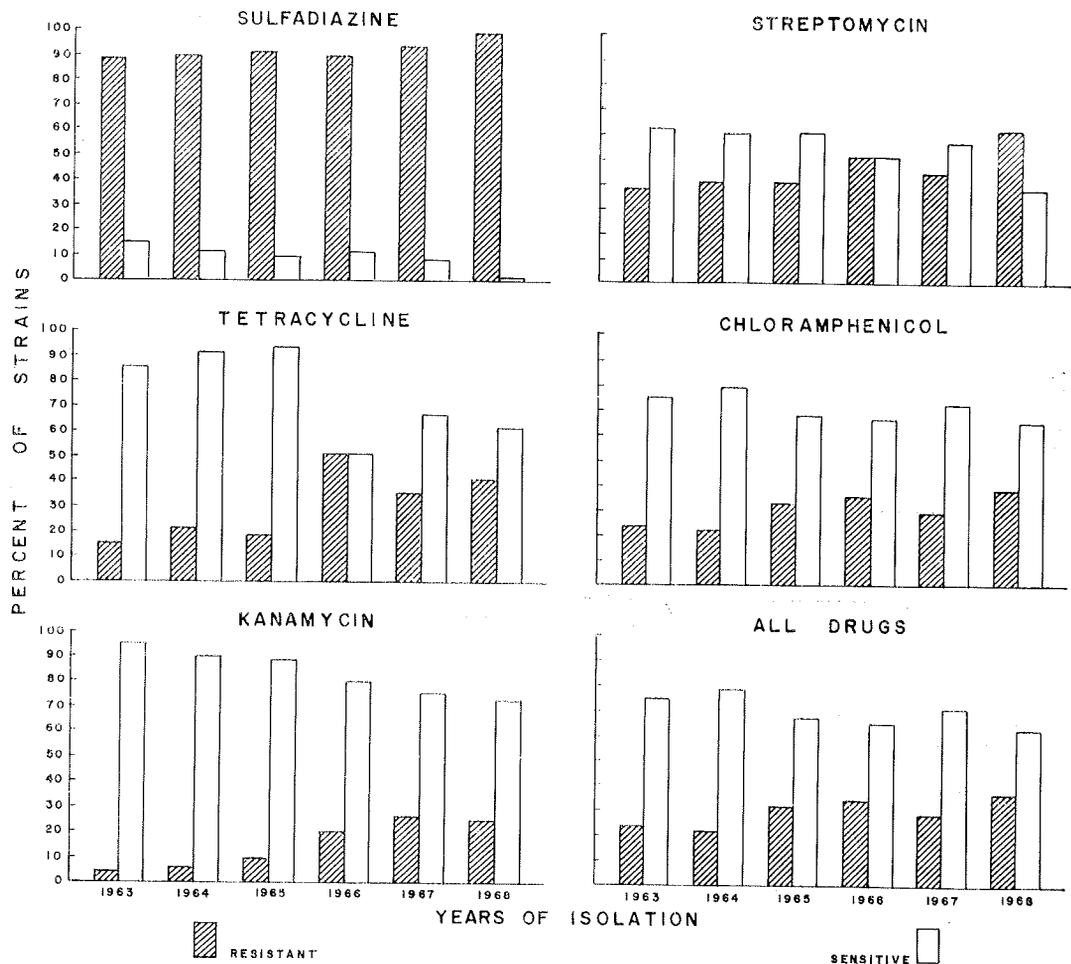


Fig. 2 — Frequency of the sensitive and resistant populations of *Shigella* according to year of isolation.

the exception of S, where the resistant population predominated over the sensitive one in 1968, and Su, the resistant population of which was very large since 1963, the sensitive populations were larger than the resistant ones, in spite of the increase in size of the latter.

Table V gives the number and the percentages of the strains with different resistance patterns. The frequency of these strains in their decreasing order was: Su (46.00%), SuS (21.66%); SuSTCK (12.33%); SuSTC (7.00%); SuST (5.66%); SuT (3.33%); SuSTK (2.66%); S (0.66%); SuTCK and SuK (0.33%). No exclusively C-, K-, or T-resistant strains were found.

Fig. 3 shows the frequency variations of the strains of known isolation date, exhibiting the most frequently encountered resistance patterns. It is evident that the frequency varied considerably from year to

TABLE V

Resistance patterns of the 300 resistant *Shigella* strains studied

	no.	%
SuSTCK	37	12.33
SuSTC	21	7.00
SuSTK	8	2.66
SuTCK	1	0.33
SuST	17	5.66
SuS	65	21.66
SuT	10	3.33
SuK	1	0.33
Su	138	46.00
S	2	0.66

Sulfadiazine (Su) — Streptomycin (S) — Tetracycline (T) — Chloramphenicol (C) — Kanamycin (K) — Hetaciline (He) — Cephalotine (Ce) — Nalidyic acid (NA) — Gentamycin (G)

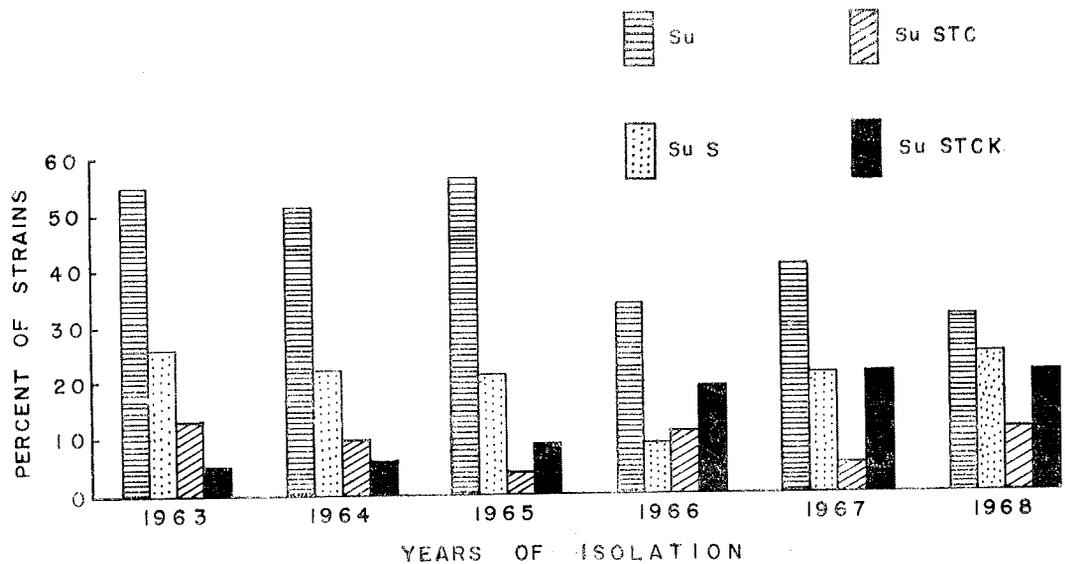


Fig. 3 — Frequency of *Shigella* strains with the most common patterns of resistance according to year of isolation.

year. However, the SuSTCK strains increased uniformly and progressively between 1963 and 1967, while the Su strains suffered a marked reduction within the last 3 years.

DISCUSSION

From the above results it is evident that the number of *Shigella* strains resistant to Su extremely high in our area; in decreasing order of frequency, strains resistant to S, T, C and K were found. Although neither the length of time nor the degree of use of each drug can be ascertained with precision, a narrow relationship exists between these factors and the number of resistant strains (Table IV), particularly when 5 older drugs (Su, S, T, C and K) and the 4 more recently introduced drugs are considered (He, Ce, NA and G). The selecting role of the 5 drugs in establishing the resistant populations is evident from Fig. 2, which gives the variations occurring during the past 5 years. The decrease of the sensitive populations and the increase of the resistant ones were, up to a degree, a constant for each drug.

Of the 300 resistant strains (Table V), 138 were resistant only to Su, 2 to S and 160 to 2 or more drugs, with a predominance of the SuS; SuSTCK, and SuSTC strains. The phenomenon of selection with respect to these strains is also evident, since a decrease of the strains exclusively resistant to Su and a progressive and constant in-

crease of the SuSTCK strains was observed. However, it should be noted that the intensity of the increase was not the same for all years. In 1967 this increase was slight, while in 1968 even a reduction of the number of the latter strains was noted. Anyway, a selection does occur and among the selected strains those with the largest number of resistances are prone to predominate.

The comparison of the present results with those of other Authors in different countries or areas, suffers from certain limitations, since the drugs used were not always the same and the degree of their use undoubtedly varied from place to place. However, the scarceness or even absence of *Shigella* cultures with resistance to a single antibiotic is noteworthy, as well as the fact that antibiotic-resistance is almost always associated with Su-resistance^{3,6} and that the exclusive resistance to Su is relatively frequent⁶. On the other hand, while the SuSTCK strains are among the most frequently encountered ones in our area, they have not been found in other countries^{3,8}.

Finally, the almost perfect characterization of sensitive and resistant populations and the possibility of distinguishing between the two with great accuracy through the maximum resistance levels of the sensitive populations and the minimum resistance of the resistant ones, must be stressed. The established limits are evidently only valid for the method used, however, the results indi-

cate that the distinction between a sensitive and a resistant bacteria is perfectly feasible. TURCK et al.⁷ arrived at the same conclusion, measuring the inhibition halo of numerous enterobacteria cultures, studied by the disc method.

The characterization of a resistant or a sensitive bacteria up to now has been somewhat arbitrary or the blood concentration attained by a drug has been taken as a basis. The results of this study, as well as the results of other Authors mentioned above⁷, indicate that the characterization can be absolute. Concurrently, the maximum resistance levels of sensitive populations, determined by the methods used, are equal or lower than the blood concentrations of the drugs⁴.

RESUMO

Resistência a nove drogas de amostras de Shigella isoladas em São Paulo

Foi investigada quantitativamente a resistência de 330 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, entre 1963 e 1968; a sulfadiazina (Su); estreptomicina (S); tetraciclina (T); cloranfenicol (C); kanamicina (K); hetacilina (He); cefalotina (Ce); ácido nalidíxico (NA); e gentamicina (G). Tendo-se por base a distribuição dos níveis de resistência das 330 amostras, foi possível a caracterização de duas populações distintas, uma constituída por amostras sensíveis e outra por amostras resistentes, com relação às 5 primeiras drogas. Com relação às 4 últimas, somente a população sensível foi encontrada. De modo geral as populações resistentes aumentaram de tamanho no decorrer dos cinco anos, não se tornando, porém, maiores do que as sensíveis, com exceção da população resistente à Su que desde 1963 representou em tórno de 90% das amostras. Foram mais frequentes as amostras Su, SuS, SuSTC e SuSTCK.

O número das amostras Su diminuiu e o das amostras SuSTCK aumentou progressi-

vamente a partir de 1963. A frequência das demais variou de ano para ano.

REFERENCES

1. GROVES, D. C. & RANDALL, W. A. — *Assay Methods for Antibiotics. A Laboratory Manual*. New York, Medical Encyclopedia, 1955.
2. HARPER, G. J. & CAWSTON, W. C. — The "in vitro" determination of the sulphonamide sensitivity of bacteria. *J. Path. Bact.*, **57**:59-66, 1945.
3. MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; EGAWA, R.; TANAKA, T. C. & NAGAI, Y. — Drug resistance of enteric bacteria. IX — Distribution of R factors in Gram-negative bacteria from clinical sources. *J. Bact.*, **93**: 1242-1245, 1967.
4. PULLEN, F. W. — Bacterial resistance to antibiotics. *Arch. Surg.*, **81**:942-952, 1960.
5. RUBINSTEIN, S. S.; PIÉCHARD, D.; BAUDENS, J. G. & FLOCH, Th. — Multirésistance aux antibiotiques: comparaison des souches selon leur sous-groupe et leur origine. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, **117**:213-221, 1969.
6. SCHUH, V. & ALDOVA, E. — Multiple drug resistant *Shigellae*. *Zbl. Bakt., I., Abt. Orig.*, **200**:460-467, 1966.
7. TURCK, M. T.; LINDEMEYER, R. I. & PETERSDORF, R. G. — Comparison of single-disc and tube-dilution techniques in determining antibiotic sensitivities of Gram-negative pathogens. *Ann. Intern. Med.*, **58**: 56-65, 1965.
8. WATANABE, T. — Infectious drug resistance in enteric bacteria. *New Engl. J. Med.*, **275**:888-894, 1966.
9. WILLIAMS, R. B. & EWING, W. H. — The susceptibility of *Shigella* and *Escherichia* to antimicrobial agents. June 1964. U. S. Department of Health, Education, and Welfare. P.H.S.
10. ZULIANI, M. E. & TRABULSI, L. R. — Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **10**:70-77, 1968.

Recebido para publicação em agosto de 1970.

ELYTROSPO-RANGIUM SPIRALE: NOVA ESPÉCIE DE ACTINO-
PLANACEAE DO GÊNERO *ELYTROSPO-RANGIUM*

J. O. Falcão de MORAIS (1)

R E S U M O

São estudadas duas amostras de actinomicetos isoladas de solo colhido nos arredores da cidade do Recife, as quais se revelaram com as características do gênero *Elytrosporangium* FALCÃO DE MORAIS, BATISTA & MASSA, 1966, isto é, produzem no micélio vegetativo esporângios em forma de vagens, os quais encerram uma fila de esporangiósporos aproximadamente globosos e imóveis, e formam micélio aéreo provido de conídios em cadeias, como acontece no gênero *Streptomyces*.

As duas amostras estudadas pertencem à mesma espécie e se distinguem da espécie-tipo do gênero, única até agora descrita, principalmente por apresentar micélio vegetativo creme ou amarelo, micélio aéreo cinza com uma tonalidade marrom, e por utilizar sacarose, rafinose, i-inositol e d-xilose quando fornecidos como únicas fontes de carbono para nutrição.

Em razão de produzir, com muita frequência, hifas aéreas espiraladas a espécie recebeu o nome de *E. spirale* sp. nov.

Cultura-tipo: Amostra C9A, depositada na ATCC sob o número 25664.

I N T R O D U Ç Ã O

Entre os *Actinoplanaceae* — actinomicetos produtores de esporângios — há um grupo que se caracteriza por produzir esporângios com a forma de vagens. O primeiro gênero desse grupo foi descrito por CROSS & col.³ sob a denominação de *Microellobosporia* e por TSYGANOV & col.¹¹ com o nome de *Macrospora*. Esta última denominação, no entender de BECKER & col.¹ não pode ser aceita por ter sido válidamente e com outra atribuição, empregada por FÜCKEL⁶.

Em 1964 o Autor estudou uma cultura isolada de solo que se distingue de *Microellobosporia* CROSS & col.³ pelo fato de produzir, como *Streptomyces*, cadeias de conídios no micélio aéreo. Esse microrganismo foi denominado *Elytrosporangium* (do grego *Elytron* = vagem) *brasiliense*, gênero e espécie novos^{4,5}. Posteriormente, na Itália e no Japão foram descritos dois novos gêneros produtores de "vagens": *Dactylospo-*

*rangium*¹⁰ e *Kitasatoa*⁷, os quais se distinguem de *Elytrosporangium* porque possuem esporangiósporos móveis.

O presente trabalho é o resultado do estudo de duas amostras isoladas de solo dos arredores da cidade do Recife, as quais se enquadram perfeitamente na descrição do gênero *Elytrosporangium*. As duas pertencem a uma mesma espécie, a qual é diferente de *E. brasiliense*. A essa espécie é dado o nome de *Elytrosporangium spirale*, em razão da facilidade com que produz hifas aéreas espiraladas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Isolamento — As amostras de solo foram suspensas e diluídas em água estéril. Gôtas das diferentes diluições foram postas em placas de Petri e meio de Czapek adicionado.

Trabalho apresentado por ocasião da I Jornada Brasileira de Microbiologia, Rio de Janeiro (GB), 4 a 5 de novembro de 1969.

(1) Instituto de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil

Culturas — As culturas aqui estudadas — C9A e IM2 — foram isoladas em abril de 1967. Antes do estudo foram conservadas em tubos com ágar inclinado (Czapek e Glicose ágar), sob óleo mineral, mantidas durante dois anos em refrigerador.

Meios de cultura — Para estudo cultural e morfológico foram empregados meios de uso corrente no estudo dos actinomicetos. A composição desses meios, que pode ser encontrada em várias publicações^{2, 9, 12}, é dada a seguir, para maior comodidade dos interessados:

- 1) *Ágar nutritivo*: Extrato de carne, 3 g; Peptona, 5 g; Ágar, 10 a 20 g, conforme a procedência; Água destilada, 1000 ml; pH 6,8 a 7,0.
- 2) *Ágar glicose*: Peptona, 5 g; Glicose, 20 g; NaCl, 5 g; Ágar, 10 a 20 g; Água destilada, 1000 ml; pH 6,8 a 7,0.
- 3) *Extrato de levedura-extrato de malte ágar*: Extrato de levedura, 4 g; Extrato de malte, 10 g; Glicose, 4 g; Água destilada, 1000 ml; Ágar, 10 a 20 g; pH 7,3.
- 4) *Batata glicose ágar*: Decocto de 200 g de batatas descascadas, filtrado através de algodão, acrescido de: Glicose, 5 g; Ágar, 10 a 20 g; Água de torneira, até 1000 ml; pH não ajustado.
- 5) *Ágar Czapek*: Nitrato de sódio, 2 g; Fosfato di-básico de potássio, 1 g; Sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,5 g; Cloreto de potássio, 0,5 g; Sulfato ferroso hepta-hidratado, 0,01 g; Sacarose, 30 g; Ágar, 10 a 20 g; Água destilada, 1000 ml; pH 6,6.
- 6) *Amido-sais minerais ágar*: SOLUÇÃO I: Amido solúvel, 10 g. Fazer uma pasta do amido com uma pequena quantidade de água destilada fria e levar a um volume de 500 ml. SOLUÇÃO II: Fosfato di-básico de potássio, anidro, 1 g; Sulfato de magnésio hepta-hidratado, 1 g; Cloreto de sódio, 1 g; Sulfato de amônio, 2 g; Carbonato de cálcio, 2 g; Água destilada, 500 ml. Solução para traços de sais (Sulfato ferroso hepta-hidratado, 0,1 g; Cloreto manganoso tetra-hidratado, 0,1 g; Sulfato de zinco hepta-hidratado, 0,1 g; Água

destilada, 100 ml), 1 ml. O pH deve ficar entre 7,0 e 7,4. Não ajustar se estiver dentro desses limites. Misturar a suspensão com a solução de sais. Ágar, 10 a 20 g; Liquefazer o ágar sob vapor fluente por 15-20 minutos.

- 7) *Asparagina-glicerol ágar*: L-Asparagina (anidra), 1 g; Glicerol, 10 g; Fosfato di-básico de potássio (anidro), 1 g; Água destilada, 1000 ml. Solução para traços de sais (ver meio n.º 6), 1 ml. O pH desta solução é aproximadamente 7,0-7,4. Não ajustar se estiver nesta faixa. Ágar, 10 a 20 g.
- 8) *Ágar aveia*: Aveia, 20 g; Ágar, 10 a 20 g. Cozinhar ou submeter a vapor fluente 20 g de aveia em 1000 ml de água destilada por 20 minutos. Filtrar através de pano. Juntar água destilada para recompor o volume de 1000 ml. Juntar 1 ml da solução para traços de sais (ver meio n.º 6). Ajustar o pH a 7,2 com hidróxido de sódio. Juntar o ágar. Liquefazer a vapor fluente por 15-20 minutos.
- 9) *Tirosina ágar*: Glicerol, 15 g; L-Tirosina, 0,5 g; L-Asparagina, 1 g; Fosfato di-básico de potássio anidro, 0,5 g; Sulfato ferroso hepta-hidratado, 0,01 g; Sulfato de magnésio hepta-hidratado, 0,5 g; Cloreto de sódio, 0,5 g; Água destilada, 1000 ml. Solução para traços de sais (ver meio n.º 6), 1 ml. pH 7,2-7,4. Ágar, 10 a 20 g. Liquefazer sob vapor fluente por 15 a 20 minutos.

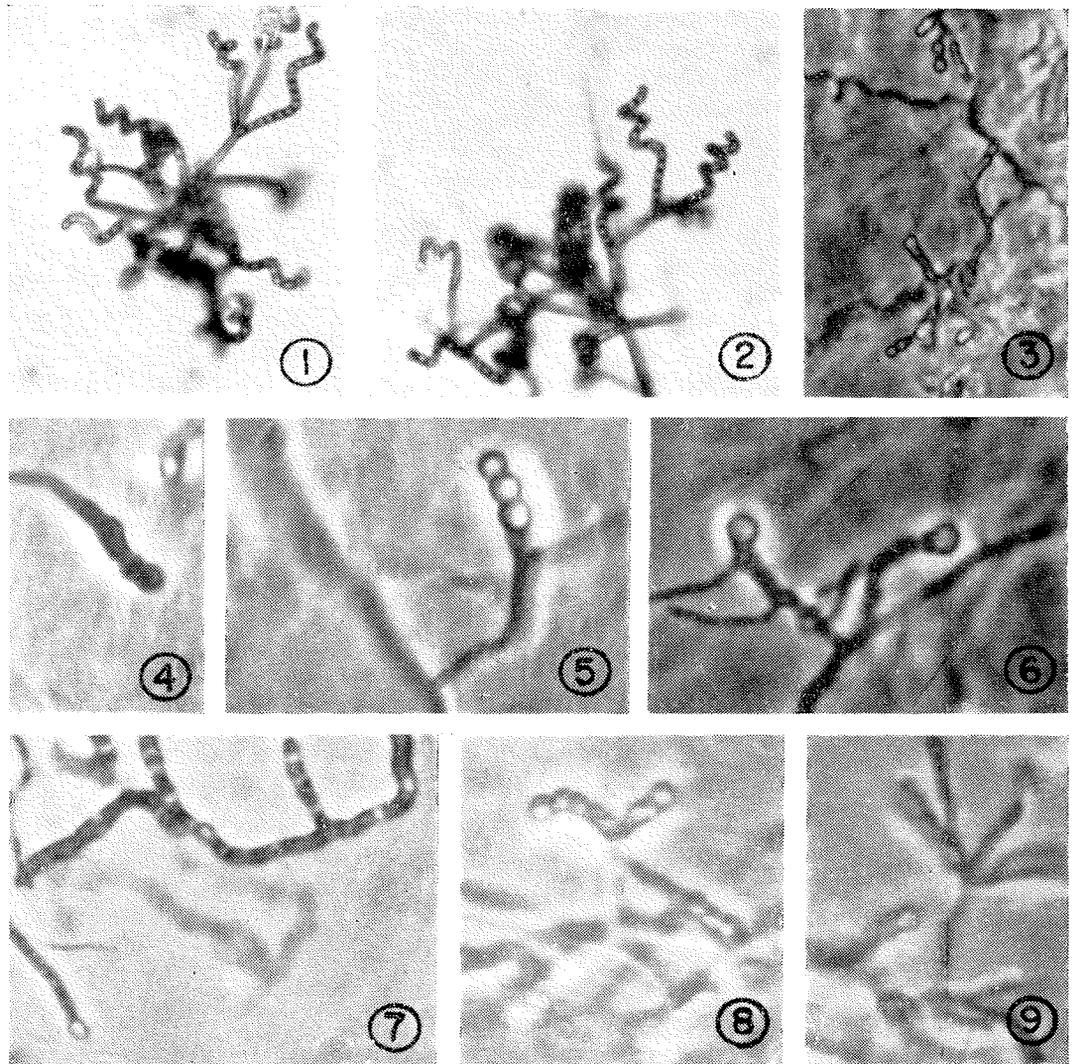
Observação — Para esterilizar esses meios geralmente usamos 115°C, 30 minutos, ou 120°C, 20 minutos.

As culturas foram incubadas a 30°C e observadas após 7, 14 e 21 dias de cultivo.

Os métodos de estudo seguidos são os indicados, salvo algumas ligeiras modificações⁹.

As técnicas de observações microscópicas são as seguidas em nosso laboratório⁴.

Fotomicrografias — Foram tomadas em microscópio Leitz, modelo Laborlux, com câmara Leica superponível e dispositivo Miccas, geralmente com o emprêgo de contraste de fase e em imersão sobre laminula, em preparações úmidas.



Figs. 1-9 — *E. spirale*. Figs. 1 e 2 — Micélio aéreo com cadeias de conídios. Culturas de 11 dias em malte-levedura ágar. 594 \times . Fig. 3 — Micélio vegetativo com esporângios. De Tirosina-ágar, 23 dias. Observação a fresco; contraste de fase. 594 \times . Figs. 4 e 5 — Micélio vegetativo. De Asparagina-glicerol ágar, 23 dias. Esporângios imaturo (Fig. 4) e maduro (Fig. 5) corados a fresco com cristal-violeta e observados em contraste de fase, por imersão sôbre a laminula. 1478 \times . Fig. 6 — Germinação de esporangiósporos. 1478 \times . Fig. 7 — Micélio vegetativo corado pelo Gram (condensações Gram-positivas). 1478 \times . Figs. 8 e 9 — Esporângios em cachos. Asparagina-glicerol ágar, 23 dias. 1478 \times . (Fig. 1 --- amostra IM2; as demais são da amostra C9A).

RESULTADOS

Descrição de *Elytrosporangium spirale* FALCÃO DE MORAES, sp. nov.

Micélio vegetativo — As hifas têm cerca de 1 μ de diâmetro; são longas, ramificadas, geralmente mostrando condensações plasmáticas facilmente visíveis pelo uso de corantes básicos; essas condensações (Fig. 7) parecem confirmar as observações anteriores⁴ de que estão relacionadas com o processo de formação dos esporângios.

As colônias são semelhantes às de *Streptomyces*, isto é, são duras, sêcas, algo penetrantes no meio; sua coloração varia de incolor a amarelo claro, a castanho, conforme o meio empregado.

Esporângios — Podem se formar após o 5.^o dia de cultivo — melhor após o 10.^o dia. Localizam-se nos extremos das hifas vegetativas ou ao longo das mesmas, isoladamente (Figs. 3, 4 e 5) ou em cachos (Figs. 8 e 9). Os esporangiósporos são globosos, imóveis e seu número varia en-

tre 1 e 6; seu diâmetro se compreende entre 1 e 2 μ . A germinação desses esporos pode ser vista com certa facilidade desde que o micélio substratal, esmagado entre lâminas, seja suspenso em água ou em meio líquido diluído e incubado por 24 a 48 horas (Figs. 6 e 7).

Micélio aéreo — Cerca de 1 a 1,5 μ de diâmetro. Em tudo semelhante ao micélio aéreo de *Streptomyces*: hifas com diâmetro ligeiramente maior do que o das hifas vegetativas; produção de conídios formando cadeias nos extremos das hifas (estas são espiraladas) (Figs. 1 e 2). Os conídios aéreos são globosos e têm cerca de 1 μ de diâmetro. Quando esporulado o desenvolvimento aéreo tem, praticamente em todos os meios, uma coloração com uma tonalidade marrom clara.

Aspecto das culturas sobre diferentes meios — *Ágar nutritivo* — Colônias incolores a creme claras, brilhantes, sem micélio aéreo. Pigmento solúvel ausente.

Ágar glicose — Colônias amarelas ou creme-amareladas. Reverso amarelado. Micélio aéreo branco. Pigmento solúvel ausente ou amarelo claro.

Extrato de levedura-extrato de malte ágar — Desenvolvimento castanho claro a marrom, precocemente recoberto com um micélio aéreo cinza-marrom claro. Reverso marrom. Pigmento solúvel marrom. Esporângios abundantes no micélio substratal.

Batata glicose ágar — Colônias de cor amarelada a marrom claro; micélio aéreo escasso, cinza-marrom claro. Reverso creme a castanho. O meio apenas escurece ligeiramente.

Batata em cunha — Colônias castanho claras, sem micélio aéreo. A batata apenas escurece um pouco.

Ágar Czapek — Crescimento creme claro, superfície brilhante. Micélio aéreo ausente ou retardado. Pigmento solúvel ausente ou amarelo esverdeado.

Amido-sais minerais ágar — Colônias cremes, recobrendo-se logo com um micélio aéreo cinza-marrom claro. Pigmento solúvel amarelado. Reverso marrom claro. Esporângios produzidos.

Asparagina-glicerol ágar — Crescimento amarelo esverdeado a castanho claro, recoberto com micélio aéreo cinza-marrom cla-

ro. Pigmento solúvel amarelado. Esporângios abundantes.

Ágar aveia — Desenvolvimento amarelo-marrom. Micélio aéreo cinza, bem desenvolvido. Reverso marrom escuro. Pigmento solúvel marrom claro.

Tirosina ágar — Colônias de cor creme que logo se recobrem com micélio aéreo cinza-marrom claro. Reverso marrom alaranjado. Leve pigmento solúvel alaranjado. Esporângios abundantes.

Leite tornassolado (Oxoid) — Desenvolvimento marrom, em anel, com algum micélio aéreo cinza. Peptonização completa aos 21 dias.

Gelatina peptona (Oxoid) — Desenvolvimento moderado, creme claro, superficial. Pigmento solúvel ausente. Liquefação de 80 a 100% aos 21 dias.

Caldo glicosado — Colônias incolores, ao longo das paredes sob o líquido, e em depósito. Pigmentos não produzidos.

Hidrólise de amido — Positiva. 7 a 8 mm ao 5.º dia e 13 a 15 mm ao 10.º dia.

Redução de nitrato a nitrito — Positiva para a amostra C9A e negativa para a IM2.

Melanina — Não produzida.

Utilização de compostos de carbono (Meio de PRIDHAM & GOTTLIEB⁸) — Todas as fontes de carbono testadas (L-arabinose, sacarose, d-xilose, i-inositol, d-manitol, d-frutose, ramnose e rafinose) foram utilizadas.

Atividade antagonista — Negativa, em estrias cruzadas, para bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

QUADRO I

Desenvolvimento de *Elytrosporangium spirale* nos meios: Extrato de levedura-extrato de malte ágar (n.º 3) e Asparagina-glicerol ágar (n.º 7), em diferentes temperaturas (Última observação ao 4.º dia)

Temperatura °C	Meio 3	Meio 7	Micélio aéreo
45 (banho água)	+	+	-
37	+++	+++	+++
30	++	++	++
22	+	+	(+)

- Nulo; (+) Muito fraco; + Fraco; ++ Moderado; +++ Bom

QUADRO II

Diferenças entre *E. spirale* sp. nov. e *E. brasiliense*

	<i>E. spirale</i>	<i>E. brasiliense</i>
Agar Czapek	Desenvolvimento creme claro, bom, superfície brilhante. Algum micélio aéreo pode existir após 20 dias. Pigmento solúvel amarelo claro.	Desenvolvimento incolor, raso, melhor visto contra a luz. Micélio aéreo ausente ou muito retardado. Pigmento solúvel ausente.
Agar glicose	Desenvolvimento amarelo. Micélio aéreo branco já existente ao 8.º dia, passa a cinza-amarelado. Reverso marrom. Pigmento solúvel amarelado ou ausente.	Desenvolvimento incolor a creme acinzentado. Micélio aéreo não produzido. Reverso da mesma cor do desenvolvimento. Pigmento solúvel ausente.
Asparagina glicerol ágar	Desenvolvimento amarelado. Micélio aéreo precoce, branco, que passa a cinza-marrom. O reverso passa de amarelado a marrom. Aos 28 dias o meio está marrom claro.	Desenvolvimento incolor a acinzentado. Micélio aéreo retardado, cinza esverdeado. Reverso incolor. Pigmento solúvel ausente.
Agar aveia	Desenvolvimento amarelo-marrom. Micélio aéreo cinza, bem desenvolvido. Reverso marrom escuro. Pigmento solúvel marrom claro.	Desenvolvimento incolor. Micélio aéreo retardado, branco a cinza claro-esverdeado. Reverso incolor. Pigmento solúvel ausente.
Extrato de levedura-extrato de malte ágar	Desenvolvimento castanho-marrom. Micélio aéreo cinza-marrom. Reverso marrom escuro. Pigmento solúvel amarelo-marrom.	Desenvolvimento creme. Micélio aéreo branco a cinza esverdeado. Reverso incolor a castanho claro. Pigmento solúvel ausente.
Utilização de compostos de carbono	Sacarose e rafinose: positiva. i-Inositol e d-xilose: positiva.	Sacarose e rafinose: negativa. i-inositol e d-xilose: fraca ou negativa.
Hifas aéreas	Espirais abertas, longas.	Espirais fechadas, curtas.
Produção de esporângios	Positiva em muitos meios.	Quase exclusiva em Czapek e em "Corn meal".

Temperatura de crescimento — Desenvolvimento fraco a 22 e a 45°C; moderado a 30°C e bom a 37°C (Quadro I).

Cultura tipo — A descrição se baseia no estudo de duas culturas (C9A e IM2), C9A (ATCC n.º 25664), sendo considerada a cultura tipo.

CONCLUSÃO

As duas amostras estudadas, pelas suas características morfológicas se enquadram perfeitamente no gênero *Elytrosporangium*; por outro lado, pelas suas características cul-

turais e bioquímicas são facilmente diferenciadas da única espécie descrita — *E. brasiliense* — (Quadro II), justificando-se, desse modo, sua descrição como espécie nova.

SUMMARY

Elytrosporangium spirale: a new species of Actinoplanaceae of the genus *Elytrosporangium*

Two strains of a new species of the genus *Elytrosporangium* FALCÃO DE MORAIS, BATISTA & MASSA, 1966, belonging to the

Later on, it was employed for diagnostic purposes^{11, 12, 13, 14, 15, 43} showing satisfactory sensibility and specificity.

LIPTON & FREUND³³ studied the appearance of complement fixating antibodies, in experimental condition, employing vaccines with adjuvants. They attempted to establish a relationship between the antibodies detected by CF test and those detected by neutralization test, but emphasized that there could not be made any extrapolation to other conditions.

LEBELL et al.³² studied 87 cases of persons vaccinated against rabies, and observed the appearance of both complement-fixating and neutralizing antibodies. The later always appeared earlier and lasted longer, but the Authors did not attempt to establish a correlation between them.

LEBEDEVA³¹, in his study of 26 cases, points out the efficiency of the test for evaluation of immunity.

The present study reports the results obtained with the CF test in the evaluation of immunity against rabies as compared to those shown by the classic serum-neutralization method. We did not attempt to establish the maximal sensibility of the test under study, since our main purpose was the standardization of a simple and inexpensive procedure that could be easily introduced as routine test in anti-rabies vaccination services.

2.

MATERIAL AND METHODS

1 — Patients

199 patients, totaling 286 cases, were classified in 3 groups (A, B, C) according to their history of vaccination against rabies:

- GROUP A: persons vaccinated for the first time — 112 cases
 GROUP B: persons revaccinated — 36 cases
 GROUP C: persons vaccinated and/or revaccinated in the past — 138 cases

In different instances the same patient was included in more than one group, therefore the number of cases is greater than the number of patients.

Group A patients received 14 doses of vaccine, with a booster dose 46-60 days after the starting dose.

Group B patients, which had already received at least 14 doses of vaccine, more than a year ago, were now revaccinated with 10 or more doses.

Group C had received at least one series

of 14 doses. Any reinforcement received after 6 months or more was considered as a new series, for this group.

2 — Serum samples

After blood collection the serum was aseptically separated and stored at -25°C until use.

Tables I and II show the period of serum collection. As can be seen on Table I, on no occasion it has been possible to obtain the serum sample from all patients at the same time.

The reproductibility of the test was studied using 48 serum samples which had been collected, separated and paired in another laboratory, without our participation.

3 — Complement-Fixation Tests

These tests were performed after the method described by FULTON & DUMBELL¹⁹, modified by SHOPE¹⁶, by microtechnique on special plates³⁸.

Procedure: 1 drop (0.025 ml) of serial twofold dilutions of serum was mixed with an equal amount of antigen (diluted 1:8) and 2 drops (0.05 ml) of complement containing two units 100% hemolytic. The mixture was then incubated for 1 hour at 37°C , before the addition of 2 drops (0.05 ml) of a 2 per cent suspension of sensitized sheep red blood cells.

After a second incubation period of 30 minutes at 37°C , with shaking after 15 minutes, the plates were transferred to a refrigerator (4°C) for 30 minutes, when the results were read. The highest dilution showing 0 to 50% of hemolysis was taken as end point. The diluent used in these tests was always a solution of Veronal buffered saline.

Antigens: two antigens were employed, starting from brains of newborn infected mice.

a) Anti-rabies vaccine prepared according to FUENZALIDA & PALACIOS¹⁸.

The titer of this antigen was obtained by block titration against hyperimmune sera prepared in donkeys. The optimal dilution 1:8 (1:4 — 1:16) has been maintained constant for over 3 years, up to this date.

b) As control antigen a suspension of normal newborn mouse brain prepared by the same procedure as described above (FUENZALIDA & PALACIOS¹⁸), was used at the same dilution (1:8) in all tests, in order to detect antibodies against nervous tissue.

TABLE I

Results of vaccination and revaccination against rabies.
Evaluation by complement-fixation test

GROUP	PERIOD OF BLOOD COLLECTION (days)	NUMBER OF SERUM	RESULTS									
			-		2		4		> 4		*AC SERA	MEAN TITER
			No	%	No	%	No	%	No	%		
GROUP A VACCINATIONS 112 CASES	0 - 2	100	91	100.0**							9	-
	14 - 20	36	9	27.3	15	45.4	6	18.2	3	9.1	3	2.0
	21 - 30	62	12	20.0	6	10.0	22	36.7	20	33.3	2	9.9
	31 - 45	62	2	3.2	18	29.2	16	25.5	26	41.6		7.8
	46 - 60	60	1	1.6	24	40.0	20	33.3	15	25.0		4.2
	61 - 90	66			13	19.4	31	46.6	22	33.2		7.0
GROUP B REVACCINATIONS 56 CASES	0 - 2	34	19	61.2	5	16.1	3	9.7	4	12.9	3	2.5
	14 - 20	30						30	100.0			89.8
	21 - 30	12						12	100.0			76.8
	31 - 45	22						22	100.0			60.5
	46 - 60	16						16	100.0			55.6
	61 - 90	13			1	7.7	1	7.7	11	84.6		30.0

* Anti-complementary.

** AC sera excluded.

The presence of anti-complementary activity was not observed, even when the antigens were used undiluted.

Brains of adult mice, rabbits and sheep infected with C.V.S. strain, as well as the Flury type of vaccine against rabies, were also used as antigens, but the results were not as good as with the Fuenzalida type vaccine.

4 — Serum-neutralization tests (NT)

The NT tests were performed following the technique developed by ATANASIU⁵ for titration of antibodies in human sera.

Serum samples and virus were diluted in 2% horse serum solution supplemented with 1.000 units of penicillin and 500 micrograms of streptomycin per ml.

The virus employed was represented by a 5% suspension of mouse brain infected with the C.V.S. strain. It was stored at -25°C until use.

The inoculated animals were observed during 15 days. Death, occurred after the 7th post-inoculation day and preceded by characteristic symptoms, were computed in the results.

RESULTS

In the study of reproductibility of the test, performed with 96 serum samples (48

pairs), the same result in both members of each pair was obtained in 41 occasions. The other 7 pairs presented a variation of never more than one dilution.

Table I shows the results of antibody search by complement fixation test with the serum from cases of groups A and B (vaccinations and revaccinations done for the present study).

Serum samples with titer under 1:2 were considered negative. The highest titer was 1:256, obtained only in cases of revaccination.

As can be seen, the appearance of antibodies had been observed in all patients by the end of vaccination. In 3 cases the antibodies were detected rather late (after 45 days in 2 cases and 60 days in the third).

The maximal mean titer was 9.9, attained within periods ranging from 21 to 30 days (Table I).

All cases of revaccination showed an earlier and more intense response, the maximal mean titer being 89.8, reached within 14-20 days.

Of the 138 patients in Group C, 63 showed complement-fixating antibodies; for the remaining 75 the result was negative. The correlation with the time elapsed since the last vaccination and with the number of previous vaccinations can be seen on Table II.

TABLE II

Persistent antibodies in persons with past vaccination. Evaluation by complement-fixation test

Last vaccination	Number of series	S e r a		
		Positive	Negative	Total
6 to 12 months	1	8	2	10
	+1	6	0	6
1 to 3 years	1	5	23	28
	+1	30	2	32
3 to 5 years	1	1	11	12
	+1	10	6	16
more than 5 years	1	1	22	23
	+1	2	9	11
Total		63	75	138

The serum neutralization test was carried out with 109 serum samples selected during different phases after anti-rabies vaccination: a) sera remaining negative by CF test after vaccination; b) positive sera under same conditions; c) positive and negative sera when tested for residual antibodies (patients of Group C); d) positive samples from patients of Group B collected at different times during and after revaccination.

The 109 serum samples were divided in groups of 15-20 according to availability of mice for inoculation. Virus titration varied from 18 to 60 LD₅₀ in the different tests.

Table III shows the results and their relationship with the titers obtained by CF test.

TABLE III

Correlation between serum-neutralization and complement-fixation tests

		CF	T i t e r s			
			—	2	4	> 4
T i t e r s	NT					
	< 25	23				23
	25 to 125	6	19	5		30
	> 125		6	14	36	56
Total		29	25	19	36	109

As can be observed, sera with positive CF test results always showed a serum neutralizing titer above 1:25; sera with complement-fixating power over 1:4 correspond to neutralizing titers higher than 1:125.

DISCUSSION

The protective role of antibodies in immunity against rabies has been repeatedly demonstrated. HABEL²² expressed it as follows: "Although they are not the only mechanism, it is now known that serum antibodies have an important participation in the efficaciousness of prophylaxis after exposure". ATANASIU et al.^{7, 6, 8, 9} conclude that lasting precocious neutralizing antibodies in adequate levels have a fundamental role in immunity. ATANASIU⁴ considers that antibody levels of 1:25 or over, when serum is tested against 20 LD₅₀ in a serum neutralization test, assure protection.

The CF test as described above ("Material and Methods") offered entirely satisfactory results, with the following advantages:

- The technique is simple, quick and economical;
- The antigen is inexpensive, stable and commercially easy to obtain; in our experience it still maintains the optimal titer after 3 years, stored at 4°C. Furthermore, it has no anticomplementary activity;
- Good reproductibility.

With such characteristics this procedure can easily be established as routine test.

Correlation with the classical standard serum neutralization test was also good, as can be observed on Table III:

- serum tested with positive results by CF always showed protective levels of neutralizing antibodies (above 1:25).

Sera with titers above 1:4, when tested by CF, always corresponded to very high levels of neutralizing antibodies (above 1:125):

- such correlation can be observed both in the rise and in the decline of antibody levels. It was also observed in the search for residual antibodies.

The difference in response between the first antigenic stimulus and the subsequent ones was quite evident. As shown on Table I, the antibody titers found in revacci-

nation cases were much higher and appeared earlier. The study of residual antibodies shows also that after revaccination the antibodies are more frequently detected for much longer periods of time (Table III). They do, consequently, fulfill the requirements established by ATANASIU et al.^{6, 7, 8, 9} for an effective protecting role: early appearance, high titerage, long duration.

It seems also clear that, in revaccination, long series are unnecessary and they increase the risk of neuroparalytic accidents. Short schedules with few doses could be employed in these cases and the immunity could be controlled through verification of the presence of antibodies by CF test. The same test could be applied to evaluate immunity in patients vaccinated in the past and having undergone new exposure, in order to ascertain whether or not revaccination is necessary.

RESUMO

A reação de fixação do complemento na avaliação da imunidade anti-rábica

Os Autores estudaram a aplicação da reação de fixação do complemento na avaliação da imunidade anti-rábica. Após estudo de 112 casos de vacinação, 36 de revaccinação e 138 de vacinação passada, concluem que a prova pode ser aplicada em condições de rotina. Apresentou ainda correlação satisfatória com a reação de sôro-neutralização, aceita como índice de proteção, em 109 soros testados.

Os Autores descrevem uma técnica simples, prática, rápida, pouco dispendiosa e de boa reprodutibilidade. Recomendam seu emprego para avaliação rotineira do estado imunitário nos serviços de vacinação anti-rábica.

REFERENCES

1. ALVORD, E. C. — Distribution and nature of the "antigen" responsible for experimental meningoencephalomyelitis in the guinea-pig. *Proc. Soc. Exp. Biol.* (N.Y.), **67**:459-461, 1948.
2. ALVORD, E. C. — Studies on the etiology and pathogenesis of experimental meningoencephalomyelitis in the guinea-pig. *J. Immunol.*, **61**:355-372, 1949.
3. APPELBAUM, E.; GREENBERG, M. & NELSON, J. — Neurological complications following antirabies vaccination. *J. A. M. A.*, **151**:188-191, 1953.
4. ATANASIU, P. — Informação pessoal, 1967a.
5. ATANASIU, P. — Titration des anticorps rabiques pratiqué sur les sérums humains. *Bull. Off. Int. Epiz.*, **67**:383-387, 1967b.
6. ATANASIU, P.; BAHMANYAR, M.; BALTAZARD, M.; FOX, J. P.; HABEL, K.; KAPLAN, M. M.; KISSLING, R. E.; KOMAROV, A.; KOPROWSKI, H.; LEPINE, P.; PEREZ GALLARDO, F. & SHAEFFER, M. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons: part I. *Bull. Org. Mond. Santé*, **14**:593-611, 1956.
7. ATANASIU, P.; BAHMANYAR, M.; BALTAZARD, M.; FOX, J. P.; HABEL, K.; KAPLAN, M. M.; KISSLING, R. E.; KOMAROV, A.; KOPROWSKI, H.; LEPINE, P.; PEREZ GALLARDO, F. & SHAEFFER, M. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons: part II. *Bull. Org. Mond. Santé*, **17**:911-932, 1957.
8. ATANASIU, P.; CANNON, D. A.; DEAN, D. J.; FOX, J. P.; HABEL, K.; KAPLAN, M. M.; KISSLING, R. E.; KOPROWSKI, H.; LEPINE, P. & PEREZ GALLARDO, F. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons: part III. *Bull. Org. Mond. Santé*, **25**:103-114, 1961.
9. ATANASIU, P.; DEAN, D. J.; HABEL, K.; KAPLAN, M. M.; KOPROWSKI, H.; LEPINE, P. & SÉRIÉ, C. — Rabies neutralizing antibody response to different schedules of serum and vaccine inoculations in non-exposed persons: part IV. *Bull. Org. Mond. Santé*, **36**:361-365, 1967.
10. BALTAZARD, M. & BAHMANYAR, M. — Essai pratique du sérum antirabique chez les mordus par loups enragés. *Bull. Org. Mond. Santé*, **13**:747-772, 1955.
11. BINDRICH, H.; POTEL, K. & KUWERT, E. — Vergleichende Untersuchungen über den Gehalt an Komplementbindenden Antigen und Gewebliche Veränderungen in Gehirn Tollwutkranker Hunde nach Experimenteller Infektion. *Arch. Exp. Vet. Med.*, **12**:134-151, 1958.
12. BULLING, E. — Die Komplementbindungs Reaction als Hilfsmittel für die Tollwut Diagnostik. *Zbl. Bakt. I. Abt.* (Orig.), **169**:161-178, 1957.
13. CASALS, J. & PALACIOS, R. — Complement-fixation in encephalitis and rabies virus infections. *Science*, **93**:162-163, 1941a.
14. CASALS, J. & PALACIOS, R. — The complement-fixation test in the diagnosis of virus infection of the central nervous system. *J. Exp. Med.*, **74**:409-426, 1941b.
15. DEPOUX, R. & ORIO, J. — Sur la reaction de fixation du complement dans la diagnostique de la rage. Deuxième note. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **51**:157-158, 1958.

16. FERRARO, A. & JERVIS, G. A. — Experimental disseminated encephalopathy. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago), **43**:195-212, 1940.
17. FREUND, J.; STERN, E. R. & PISANI, T. M. — Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea-pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J. Immunol.*, **57**:179-194, 1947.
18. FUENZALIDA, E. & PALACIOS, R. — Rabies vaccine prepared from brains of infected suckling mice. *Bol. Inst. Bact. Chile*, **8**:3-10, 1955.
19. FULTON, F. & DUMBELL, K. R. — The serological comparison of strains of influenza virus. *J. Gen. Microbiol.*, **3**:97-101, 1948.
20. HABEL, K. — Effect on immunity to challenge and antibody response of variation in dosage schedule of rabies vaccine in mice. *Bull. Org. Mond. Santé*, **14**:613-616, 1956.
21. HABEL, K. — Seroprophylaxis in experimental rabies. *Pub. Hlth. Rep.*, **60**:545-560, 1945.
22. HABEL, K. — Vaccination and serum prophylaxis of rabies in man. International Symposium on Rabies, Talloire, 1965. *Ser. Immunobiol. Stand.*, **1**:293-305, 1967.
23. HALPERN, B. N.; BERTRAND, I. & LHERMITTE, F. — L'encephalomyélite allergique expérimentale. *Presse Méd.*, **58**:684-687, 1950.
24. HELLER, O. & TOMARKIN, E. — Ist die Methode der Komplementbindung beim Nachweis spezifischer Stosse für Hundswut und Vaccine brauchbar. *Deutsch. Med. Wchnschr.*, **33**:795-797, 1907.
25. INNES, J. R. M. — Experimental "allergic" encephalitis: attempts to produce the disease in sheep and goats. *J. Comp. Path.*, **61**:241-250, 1951.
26. JERVIS, G. A. — Experimental allergic encephalitis in animals and its bearing upon the etiology of neuroparalytic accidents following antirabies treatment in man. *Bull. Org. Mond. Santé*, **10**:837-844, 1934.
27. KABAT, E. A.; WOLF, A. & BEZER, A. E. — Rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of brain tissue with adjuvants. *Science*, **104**:362-363, 1946.
28. KABAT, E. A.; WOLF, A. & BEZER, A. E. — The rapid production of acute disseminated encephalomyelitis in rhesus monkeys by injection of heterologous and homologous brain tissue with adjuvants. *J. Exp. Med.*, **85**:117-129, 1947.
29. KABAT, E. A.; WOLF, A. & BEZER, A. E. — Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J. Exp. Med.*, **88**:417-425, 1948.
30. KOPROWSKI, H. & JERVIS, G. A. — Further studies in experimental allergic encephalitis in the guinea-pig. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **69**:472-476, 1948.
31. LEBEDEVA, I. R. — The use of complement-fixation reaction for the assessment of the rabies vaccination efficacy (russian). *J. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, **10**:71-75, 1965.
32. LEBELL, I.; DEBOER, C. J.; HAZZ, E. L. & COX, H. R. — Complement-fixing and neutralizing antibodies on human vaccinated against rabies. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **73**:225-228, 1950.
33. LIPTON, M. M. & FREUND, J. — Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue with adjuvants. *J. Immunol.*, **71**:98-109, 1953.
34. LIPTON, M. M. & FREUND, J. — The formation of complement-fixing and neutralizing antibodies after the injection of inactivated rabies virus with adjuvants. *J. Immunol.*, **64**:297-303, 1950.
35. LUMSDEN, C. E. — Experimental "allergic" encephalomyelitis. *Brain*, **72**:198-226, 1949a.
36. LUMSDEN, C. E. — Experimental "allergic" encephalomyelitis. II — On the nature of encephalitogenic agent. *Brain*, **72**:517-537, 1949b.
37. MARIE, A. C. — *Report to the international rabies conference.* Paris, 1927.
38. MONTEIRO, E. V. L. & PEREIRA, O. A. — "Batoques" de polietileno no preparo de placas para hemaglutinação e fixação do complemento. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **3**:209-212, 1961.
39. MORGAN, I. M. — Allergic encephalomyelitis in monkeys in response to injection of normal monkey nervous tissue. *J. Exp. Med.*, **85**:131-140, 1947.
40. MORRISON, L. R. — Disseminated encephalomyelitis experimentally produced by the use of homologous antigen. *Arch. Neurol. Psychiat.* (Chicago), **58**:391-416, 1947.
41. MULLER, E. — Ueber akute Paraplegien nach Wutschutzimpfungen. *Deutsch. Z. Nervenheilk.*, **34**:252-258, 1908.
42. OLITSKY, P. K. & TAL, C. — Certain properties of the casual agent of experimental disseminated encephalomyelitis in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, **78**:607-610, 1951.
43. RICE, C. E. — The use of complement-fixation tests in the study and diagnosis of viral diseases in man and animals. A review. *Canad. J. Comp. Med.*, **24**:1-5, 1960.
44. SALIDO-RENGELL, F. — Respuesta serológica de personas vacunadas contra la rabia con vacuna de tipo Fuenzalida. *Rev. Invest. Salud Publica (Mex.)*, **24**:157-168, 1969.

45. SILVA, E. P. — Substances rabicides dans le sang des individus traités par les virus rabiques fixe éthérisé. *Arq. Inst. Bact. Cam. Pest.*, 6:42-55, 1927.
46. SHOPE, R. E. — Informação pessoal, 1965.
47. STUART, G. & KRIKORIAN, K. S. — The rabicidal antibody content of rabbit immune-serum as an index of acquired resistance to rabies infection. *J. Hyg.*, 32:489-493, 1932.
48. STUART, G. & KRIKORIAN, K. S. — Studies in antirabies immunization. *J. Hyg.*, 29:1-34, 1929.
49. THOMAS, L. & PATERSON, SMITHWICK — Acute disseminated encephalomyelitis following immunization with homologous brain extracts. *J. Exp. Med.*, 92:133-152, 1950.
50. UEKI, H.; KATO, T.; OISHI, J.; MURAKAMI, H. & SHIMADA, K. — Observations of the time of appearance of Negri bodies, complement-fixing antigen, and virulence in mouse brains inoculated with rabies street-virus. *Amer. J. Vet. Res.*, 18:216-218, 1957.

Recebido para publicação em novembro de 1970.

GROWTH FACTORS FOR *CRITHIDIA FASCICULATA* ABOVE 33°C

Isaac ROTTMAN (1)

S U M M A R Y

Studying the growth of *Crithidia fasciculata* at 33°C and 34°C, the Author has found out that besides a high critical osmotic level of the medium, there was also a requirement of the flagellate for a lipidic factor, i.e., oleic acid.

In a defined medium, developed for growing *Crithidia fasciculata* at 28°C, the flagellate grows well up to 32°C. Above this temperature, there is a growth reduction, and no growth at 33°C. When a concentrated medium is used instead, good growth can be obtained at 33°C. Addition of several substances as KCl, KBr, NaCl and others can replace the concentrated medium required at this temperature. Such results pointed out that an absolute osmotic requirement emerged for growth of *C. fasciculata* at 33°C (ELLENBOGEM, B. B.; HUTNER, S. H. & O'CONNELL, K. M. — *J. Protozool.* (Suppl.) 16:13, 1969).

In an attempt to grow the protozoa above 33°C, we found a requirement for a lipid, in addition to the high osmotic condition, which can be supplied as lecithin or "Tween 80".

The medium used had the following composition: potassium citrate 0.2%, citric acid 0.1%, L-malic acid 0.04%, succinic acid 0.2%, MgCO₃ 0.2%, metal mixture 0.02%, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ 6 H₂O 2 mg%, CaCO₃ 4.0 mg%, adenine 4.0 mg%, sorbitol 3.0%, Na₂-glycerophosphate 5 H₂O 2%, Ca pantothenate 0.2 mg%, nicotinamide 0.2 mg%, Na-riboflavin PO₄ 0.12 mg%, thiamine 0.06 mg%, biotin 0.0004 mg%, pyridoxamine 2 HCl 0.06 mg%, folic acid 0.4 mg%, hemin (in quadro) 2 mg%, L-arginine 0.08%,

L-histidine HCl H₂O 0.06%, L-isoleucine 0.04%, L-leucine 0.04%, L-lysine HCl 0.04%, L-phenylalanine 0.04%, L-threonine 0.04%, L-tryptophan 0.02%, L-tyrosine ethyl ester HCl 0.04%, L-valine 0.04%, L-methionine 0.04% (pH 6.5). The experiments were made in 25 ml flasks with a final volume of 5 ml. The incubation was carried out in an electric incubator with the door permanently closed during incubation. Growth was optically estimated with a densitometer.

Lecithin or "Tween 80" had no effect on growth at 28°C (Table I). With an increase of temperature (33°C), both substances showed moderate stimulatory effect. At 34°C, even the concentrated medium produced poor growth in absence of the lipid sources. A remarkable effect on growth was shown by high concentration of "Tween 80" at this temperature.

The lipid and osmotic requirements, for growing *C. fasciculata* above 33°C suggest that a temperature damage of the membrane may occur at high temperature. The requirement for lecithin or "Tween 80" (sorbitan mono-oleate polyoxyethylene) can be explained by a common factor present in the two lipid sources, i.e., oleic acid. The relation between oleic acid and temperature has been shown with other systems. With *Saccharomyces cerevisiae*, the addition of

Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, G.B., Brasil. Part of this work was done at Haskins Laboratories, New York, U.S.A.

(1) Fellow of the Conselho Nacional de Pesquisas.

TABLE I

Effect of lecithin and "Tween 80" on the growth of *Crithidia fasciculata* at high temperature

Additions		Optical density after 5 days		
		28°C	33°C	34°C
None		1.16	0.76	0.24
Lecithin	20.0 mg%	1.16	0.91	0.49
Lecithin	50.0 mg%	1.18	0.99	0.63
Lecithin	100.0 mg%	1.16	1.03	0.65
"Tween 80"	20.0 mg%	1.00	0.90	0.48
"Tween 80"	50.0 mg%	1.16	0.98	0.83
"Tween 80"	100.0 mg%	1.22	1.08	0.99

oleic acid avoids the thermal death at 40°C (SHERMAN, F. — *J. Cell. Comp. Physiol.*, 54:29-35, 1959). In *Rhodotorula gracilis*, the lipid content decreases when the temperature of incubation is increased from 27 to 35°C, with a slight tendency of the concentration of oleic acid to increase as the temperature decreases (ENEBO, I. & IWAMOTO, H. — *Acta Chem. Scand.*, 20: 439-443, 1966). Our results may indicate a loss of the physiologic capacity in trypanosomatids at high temperature in such a way as to arise to host dependence.

RESUMO

Fatores de crescimento de Crithidia fasciculata à temperaturas superiores a 33°C

Estudando o cultivo de *Crithidia fasciculata* a 33°C e a 34°C, concluiu o Autor que, além de exigir um elevado nível osmótico do meio, constituía fator essencial para o flagelado, um elemento lipídico, isto é, ácido oleico.

Recebido para publicação em 1-4-1970.

ISOLATION OF THREE NEW SEROTYPES OF *ERYSIPELOTHRIX RHUSIOPATHIAE*

A. F. Pestana de CASTRO⁽¹⁾, Luiz Rachid TRABULSI⁽²⁾, Oswaldo
CAMPEDELLI Filho⁽¹⁾ and C. TROISE⁽¹⁾

S U M M A R Y

Three new serotypes of *Erysipelothrix rhusiopathiae*, isolated from the tonsils of pigs and corporal surface of marine and fresh water fish, are described. These three types are temporarily denominated as I, J and K.

The first evidence on antigenic differences among strains of *E. rhusiopathiae* was reported by WATTS, P. S. (*J. Path. Bact.*, 50:355, 1940) who described two serological types according to the presence, on these strains, of a specific thermostable component.

Studies carried out by ATKINSON, N. & COLLINS, F. V. (*Aust. Vet. J.*, 16:193, 1940) and DEDIÉ, K. (*Exp. Vet. Med.*, 2:56, 1950) confirmed Watts' findings and another type of *E. rhusiopathiae* was characterized by the absence of any specific thermostable antigen detectable by the precipitin reaction. This type was called N form and the types described by WATTS, P. S. were denominated types A and B.

Later, two other serological types were described by HEUNER, F. (*Arch. Exp. Vet. Med.*, 12:40, 1958) who designated them C and KUCSERA, D. G. (*Acta Acad. Sci. Vet. Hung.*, 13:61, 1963 and 14:293, 1964) described the types E and TRUSZCZYNSKI, G. M. (*Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 7:85, 1963), who did not follow this sort of nomenclature, reported another type called by him P. Despite the fact that this Author compared his strain only with, MURASE, N. et al. strains (*Jap. J. Vet. Sci.*, 21:113, 1959; 21:215, 1959; 22:1, 1960), comparative studies carried out by us proved that this type is indeed a new type, unless it is identical to the H type, recently described by EWALD,

F. W. (*Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 80:1, 1967) and not included in our research.

The main purpose of this note is to report the isolation of three new serotypes of *E. rhusiopathiae* identified when 73 strains isolated from tonsils of normal pigs and 29 from the corporal surface of marine and fresh water fish were examined serologically according to the technique described by SHUMAN, R. D. (Iowa, Iowa State University Press, 1959, p. 335). Strains belonging to the types already described, i.e., A, B, C, D, E, G and P were found among our isolates. Furthermore, 17 strains behaved as N forms whereas 13 strains, when tested by the immunodiffusion techniques with antisera prepared against the standard strains, did not show any precipitation line. However acetic acid extracts prepared with these "apparent N forms", when tested with homologous antisera, gave a strong line of precipitation. Cross-precipitation tests, performed with these strains and the respective antisera, allowed us to separate them in three groups. Although we did not compare our new types with the H type described recently by EWALD, F. W. (*Berl. Münch. tierärztl. Wschr.*, 80:1, 1967) we decided to call them I, J and K temporarily, since KUCSERA, G. (personal communication) found out that our strains do not belong to the H type. These serotypes, except K, were found in both, pigs and fish (Table I).

(1) Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil

(2) Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil

TABLE I
Strains belonging to the new types of
E. rhusiopathiae

Serological types	Strains
I	S52, S71, P3, P26, P28
J	S60, S62, S65, S66, P23
K	S4, S10, S61

S = strains isolated from pigs

P = strains isolated from fish

Several Authors (*Acta Acad. Sci. Vet. Hung.*, 13:61, 1963; 14:293, 1964; *Jap. J. Vet. Sci.*, 22:1, 1960) have claimed about the importance of serological studies on *E. rhusiopathiae* and its relationship with the epidemiology and pathogeny of the infection among human beings and animals. The report of these three new serotypes reinforces this fact and shows that further studies on this field will be necessary in order to sort out the range of the serological types of

E. rhusiopathiae and the role played by them on infections caused by this microorganisms in men and animals.

RESUMO

Isolamento de três novos sorotipos de Erysipelothrix rhusiopathiae

Três novos sorotipos de *E. rhusiopathiae*, isolados de amígdalas de suínos aparentemente normais e da superfície corporal de peixes, foram identificados através da técnica de imunodifusão em gel usando-se antissoros preparados contra amostras pertencentes aos tipos sorológicos A, B, C, D, E, G e P. Aos tipos novos foram propostas as denominações I, J e K.

Recebido para publicação em setembro, 1970.

DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS LEPTOSPIROSES

C. A. SANTA ROSA (1)

RESUMO

Foi feita uma revisão dos métodos de diagnóstico das leptospiroses. Todas as técnicas (exame microscópico, cultivo, inoculação e pesquisa de anticorpos) foram detalhadamente discutidas e avaliadas.

O trabalho inclui ainda um apêndice contendo algumas técnicas de coloração, meios de cultura e outros reagentes.

INTRODUÇÃO

Por volta de 1886, WEIL descreveu uma doença caracterizada por febre, icterícia, hemorragias, comprometimento hepático e renal. Foi a primeira descrição de leptospirose humana, que depois passou a se chamar Doença de Weil, quando apresenta este quadro e é causada pelo sorotipo *icterohaemorrhagiae*.

Cerca de 30 anos mais tarde, os pesquisadores japoneses isolaram o agente etiológico da doença e logo depois foi criado o gênero *Leptospira*.

Mais ou menos naquela época, começaram também a aparecer os primeiros trabalhos brasileiros, principalmente sobre roedores. Mas o interesse pelo assunto entre nós, realmente, só foi despertado alguns anos depois.

Desde aqueles tempos têm se expandido muito os conhecimentos sobre as manifestações clínicas das leptospiroses humana e animal, sua distribuição em animais silvestres e ainda os aspectos epidemiológicos. No homem, como nos animais, as manifestações clínicas variam muito em tipo e severidade, podendo a infecção ocorrer de forma assintomática. Por isto, é de suma importância a necessidade do diagnóstico laboratorial não somente para uma confirmação dos casos clínicos, como também para identificar animais portadores, determinar a extensão do problema e desenvolver medidas de controle da doença.

Atualmente, há uma variedade de métodos para o diagnóstico de laboratório das leptospiroses que podem ser usados com relativa facilidade em muitos laboratórios de análises clínicas, de hospitais e de institutos de pesquisa. É óbvio que para isto há necessidade de pessoal habilitado e de um pequeno equipamento especializado que, no geral, serve também para outros diagnósticos laboratoriais. Além disso, o sucesso dos métodos depende muito de sua aplicação adequada, bem como da colheita e transporte do material a ser examinado. Há ainda necessidade de uma estreita cooperação entre os clínicos médico e veterinário, microbiologista e os especialistas no assunto.

Em nosso país, com exceção de São Paulo, pouquíssimas são as cidades onde se pode fazer um simples diagnóstico sorológico de Leptospirose.

É, pois, com a finalidade de ajudar aqueles que desejam fazer o diagnóstico laboratorial de Leptospirose que fazemos esta revisão.

No diagnóstico de laboratório das leptospiroses os principais métodos empregados são a visualização de leptospiras em líquidos e tecidos dos pacientes, o isolamento das mesmas e a pesquisa de anticorpos.

I — VISUALIZAÇÃO

O diagnóstico das leptospiras no homem e nos animais domésticos, por meio de um

(1) Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

exame microscópico direto, nos líquidos ou tecidos, tem uma aplicação, até certo ponto, limitada e depende da presença de leptospiras naqueles tecidos e líquidos.

1. *Exame em campo-escuro*

a) *De sangue*

Pelo fato de serem espiroquetas de corpo muito fino, a visualização de leptospiras no sangue ou em outros materiais a fresco, não pode ser feita em microscópio com o condensador comum de campo-claro. Elas só poderão ser vistas nestas preparações se o microscópio fôr provido de iluminação com campo-escuro.

Assim, durante o período de leptospiremia da doença, elas estão no sangue circulante e podem ser visualizadas em um exame direto do material a fresco. Esta visualização, porém, não é tão fácil como parece porque elas estão presentes apenas durante os primeiros dias da doença, no estágio febril e sem que se haja feito qualquer aplicação de antibióticos no paciente. Além disto, deve-se levar em conta que o número de leptospiras contidas numa gôta de sangue, em geral não é muito grande. Nas inúmeras vezes em que examinamos sangue de cobaias infetados, no período febril, poucas foram as ocasiões em que vimos leptospiras.

Convém chamar aqui a atenção para o fato de que aos olhos das pessoas ainda não habituadas com a aparência de leptospiras em campo-escuro, confusões podem se estabelecer com filamentos de fibrina que saem dos glóbulos vermelhos e brancos e se assemelham a leptospiras. Estas porém, têm uma morfologia bem definida além de movimentos bem distintos, enquanto aqueles filamentos diferem por serem mais espessos e não apresentarem movimentação própria.

b) *De urina*

Leptospiras, em geral, aparecem na urina dos doentes durante a segunda semana da doença e podem nela persistir por cerca de trinta dias (no homem) e em períodos mais longos e bastante variáveis (nos animais domésticos).

Como leptospiras podem ser lisadas pela urina ácida, deve ser dada ao paciente uma dieta alcalina alguns dias antes de se colher a urina, se fôr permitido clinicamente. Deve-se colher a segunda da manhã, centrifugá-la durante cerca de 10 minutos, a 3.000 r.p.m. e examinar o sedimento. O transporte demorado de amostras de urina

para o laboratório diminui as chances de um resultado positivo.

c) *Líquido céfalo-raquidiano*

Leptospiras podem nêlo aparecer no fim da primeira semana da doença mas geralmente, são em número muito pequeno. Por isto nem sempre é fácil vê-las ao campo-escuro.

Os exames em campo-escuro acima comentados não devem ser tomados como um método ideal de diagnóstico laboratorial e sim como um método auxiliar e demonstrativo.

2. *Coloração argêntica*

Nos casos fatais, leptospiras podem ser vistas em cortes histológicos de rins e fígado corados pelo método de Levaditi, que segue uma técnica de impregnação pela prata. Na opinião de alguns, êste método tem muitas desvantagens porque os resultados são inconstantes, assim como as técnicas e os reagentes são falhos. Isto se refere, em particular, aos métodos de Fontana para esfregaços e Levaditi para os cortes de tecidos. Além disto, falta especificidade de métodos para espiroquetas em geral, bem como para leptospireose, porque outros elementos dos tecidos são argentófilos, principalmente os pigmentos hematógenos, os núcleos e a melanina.

Pelo método de Levaditi, o bloco inteiro do tecido deve ser tratado pela prata, antes de serem feitos os cortes. Outra técnica consiste no tratamento de cortes individuais pelo reagente.

Para esfregaços, o método mais usado tem sido o de Fontana-Tribondeau, cuja descrição se acha no apêndice desta revisão. Há poucos anos porém, outro método foi desenvolvido, também para esfregaços que serve não somente para leptospiras como ainda para flagelos de outras bactérias. Êste método apresenta as seguintes vantagens: os reagentes são de fácil aquisição; os esfregaços de sangue ou as impressões de tecidos são secados ao ar e não fixados quimicamente; as preparações podem ser feitas em poucos minutos e examinadas tão logo estejam secas; por fim, a morfologia das leptospiras é preservada e não há problemas de precipitação de reagentes.

3. *Coloração direta*

Outros métodos de coloração, usando-se alguns corantes habituais em bacteriologia,

podem ser empregados para demonstração com a mesma praticabilidade dos métodos de impregnação pela prata, porém são menos eficientes do que outros métodos de demonstração de leptospiras. Entre eles estão a coloração por violeta de metila e a coloração negativa pelo vermelho Congo.

4. *Técnicas de imunofluorescência*

Estas técnicas podem ser aplicadas com sucesso na visualização de leptospiras em preparações tissulares e na urina. Poucos porém têm sido os trabalhos até agora publicados sobre técnicas de imunofluorescência na demonstração de leptospiras. Estas técnicas têm algumas vantagens se bem que, até certo ponto, teóricas. Em primeiro lugar, as leptospiras coram-se bem pelo isotiocianato de fluoresceína e esta coloração inegavelmente traduz uma reação antígeno-anticorpo específica para leptospiras. Então a técnica demonstra não somente leptospiras íntegras nos esfregaços ou nos cortes de tecidos como também fragmentos delas.

As técnicas direta e indireta podem ser usadas. A primeira em esfregaços de urina e impressões de tecidos e a segunda na pesquisa de anticorpos.

II — MÉTODOS SOROLÓGICOS

Os componentes antigênicos das leptospiras são complexos e não estão ainda muito bem compreendidos. Apesar disto, são as reações antígeno-anticorpo as que se usam na rotina de diagnóstico das várias leptospiroses, nos inquéritos sorológicos, nos estudos de anticorpos residuais no homem, animais domésticos e silvestres.

Muitos testes sorológicos foram até agora estudados para o soro-diagnóstico das leptospiroses, baseados todos na demonstração de anticorpos no soro dos pacientes. Nem todos, porém, são práticos para uma rotina de laboratório. Daremos aqui alguns exemplos começando pelo mais usado.

1. *Soro-aglutinação microscópica*

A soro-aglutinação microscópica ainda é o método de preferência para o diagnóstico sorológico das leptospiroses e para a classificação sorológica de leptospiras.

Há dois pontos muito importantes neste teste: a densidade do antígeno e a definição do título final numa diluição de soro. Com relação ao primeiro a recomendação do Grupo de Leptospiroses da Organização Mundial

da Saúde é para que se use, no teste, antígenos vivos, culturas em meio líquido, entre 4 e 14 dias de crescimento e tendo uma densidade de aproximadamente 50 a 100 milhões de organismos por mililitro, numa mistura final de soro e antígeno. Para tanto, a densidade do antígeno pode ser dada por métodos nefelométricos ou pelo uso de uma câmara especial adaptada ao microscópio para contagem dos organismos em campo-escuro. Por esta contagem o antígeno ideal será aquele que contenha pelo menos de 100 a 200 organismos por campo microscópico, usando-se uma ocular 10 × e uma objetiva 45 ×. Além disto, deve o antígeno estar livre de contaminação e livre de autoaglutinação.

O grau de aglutinação neste teste vai de 100% (quando nenhuma leptospira solta é vista em campo-escuro entre os grumos de aglutinação) até uma percentagem menor no soro mais diluído. Este grau de aglutinação só pode ser determinado em termos de proporção de leptospiras livres. Aceita-se como ponto final de uma reação de soro-aglutinação, a diluição final do soro, na qual 50% ou mais de leptospiras são aglutinadas, enquanto menos de 50% de leptospiras permanecem livres quando comparadas com as suspensões de controle que devem ser feitas com o antígeno representando 25%, 50% e 75% de células.

Na soro-aglutinação microscópica dois tipos de antígenos podem ser usados: a) antígenos vivos e b) antígenos formolizados.

a) *Preparo dos antígenos*

As cepas que habitualmente usamos como antígenos, são repicadas cada sete dias e mantidas em meio de Stuart. Houve época em que trabalhamos também com o meio de Korthoff. Ambos são bons e fornecem bons antígenos. A mudança de um para outro se deu apenas porque o meio de Stuart comercial (Difco) é mais fácil e mais rápido de ser preparado. Na rotina usamos repicar cerca de 6 tubos 18 × 180 mm, contendo 5 ou 10 ml do meio líquido em questão (quantidade suficiente para a rotina sorológica de uma semana útil); dependendo do volume de soros a examinar são usados quatro ou cinco dos tubos repicados deixando-se sempre um tubo de reserva, de cada antígeno, para ser usado como matriz nos repiques da semana seguinte. Após o repique, que deve ser feito com um inóculo na proporção de 10% do volume de meio a semear, os tubos são incubados em estufa en-

tre 28 a 30°C. Os antígenos são então usados a partir do quarto ou quinto dia após a semeadura e depois de terem sido examinados quanto à pureza e auto-aglutinação. A verificação de densidade conforme recomendado, não é fácil. Assim nos baseamos na idade do antígeno e quando dentro da faixa preestabelecida êle está muito denso, diluimos com o próprio meio de cultura. Os antígenos muito densos são menos sensíveis, mas na prática a diferença de sensibilidade observada em antígenos frente a soros com anticorpos é muito pequena quando se tem um antígeno mais ou menos denso. Em geral, as culturas com o tempo de crescimento estabelecido, apresentam uma densidade satisfatória.

Uma bateria ideal de antígenos para o sorodiagnóstico das leptospiroses é aquela que contém um sorotipo representativo de cada sorogrupo. São, portanto, 17 representantes dos sorogrupos patogênicos e 2 dos apatogênicos, conforme a última lista publicada pela O.M.S. datada de 1967. As cepas que se incluem numa bateria de antígenos devem ser cepas de referência, mas de acordo com as condições locais de cada país ou mesmo região, estas cepas podem ser substituídas, aumentadas ou suprimidas. O Grupo de Leptospiroses da O.M.S. sugere a seguinte bateria de antígenos:

Sorotipo	Amostra
1 — <i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
2 — <i>javanica</i>	Veldrat Batavia 46
3 — <i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
4 — <i>castellonis</i>	Castellón 3
5 — <i>pyrogenis</i>	Salinem
6 — <i>butembo</i>	Butembo
7 — <i>autumnalis</i>	Akiyami A
8 — <i>bratislava</i>	Jez Bratislava
9 — <i>pomona</i>	Pomona
10 — <i>grippotyphosa</i>	Moskva V
11 — <i>wolffi</i>	3705
12 — <i>borincana</i>	HS 622
13 — <i>bataviae</i>	Van Tienen
14 — <i>tarassovi</i> (ex <i>hyos</i>)	Perepelicin
15 — <i>patoc</i>	Patoc I.

No laboratório de trabalho do Autor, a bateria de antígenos em uso de rotina contém quatro sorotipos a mais do que aquela acima sugerida. São êles: *panama*, *celledoni*, *shermani* e *brasiliensis*. Os três primeiros por representarem três sorogrupos distintos e que não constam da lista acima, e a última por ser de interesse regional. Ainda na mesma bateria, no sorogrupo *Hebdomadis* ao invés de usarmos *borincana* e *wolffi* usamos somente o último, em virtude de já ter sido isolado em São Paulo, de um

paciente e de rato silvestre. Êste sorotipo tem sido encontrado em soros de bovinos, aqui entre nós, numa incidência muito alta, predominando mesmo sobre os demais. O sorotipo *bratislava* é na bateria do Autor substituído pelo sorotipo *australis* (cepa Ballico), que encabeça o sorogrupo que ambos representam.

Vê-s, pois, que de acordo com o interesse regional, em um país da extensão do Brasil, esta bateria pode ser alterada se no extremo norte forem encontrados sorotipos diferentes.

b) Técnica da sôro-aglutinação

O sôro a testar é inicialmente diluído a a 1/100 em salina fisiológica estéril, (9,9 ml de salina + 0,1 de sôro). Desta diluição colocam-se 0,2 ml em tubos 13 x 100 mm, tantos quantos forem os antígenos a empregar. Em seguida, coloca-se igual quantidade de cada antígeno, um para cada tubo; agita-se ligeiramente a estante e leva-se à estufa 28-30°C durante 3 horas. Decorrido êste tempo faz-se então a leitura microscópica em campo escuro, usando-se preferencialmente uma ocular 10 ou 15 x e uma objetiva de baixo aumento. O ideal será ter-se um aumento de 100-120 vezes. De cada tubo coloca-se uma gota na lâmina, com uma pipeta Pasteur ou com uma alça de platina e leva-se ao microscópio para leitura.

Na leitura o grau de aglutinação deve ser computado de 4+ quando 75-100% das leptospiroses se acham aglutinadas, 3+ quando aproximadamente 75% se aglutinam, 2+ com 50% aglutinadas e 1+ com pelo menos 25% dos organismos aglutinados. Considera-se como positivo o sôro que no campo-escuro mostrar uma reação de 2+.

A etapa seguinte é a titulação dêste sôro que é feita no dia imediato. Para o clínico o resultado pelo teste da triagem já é suficiente. Mas se houver interesse no título prossegue-se então com o teste.

Em nossa rotina, em geral preparamos uma série de tubos, 7 ao todo, que corresponde a uma diluição de 1/12.800 na mistura sôro + antígeno. Usamos nas diluições uma série geométrica à razão de dois. O título final é considerado naquela diluição que mostrou um campo-escuro com 50% das leptospiroses aglutinadas; foi o mesmo critério que se adotou na leitura de triagem. Se o sôro, em exame na diluição de 1/12.800, mostrar uma reação de 3 ou 4+ fazemos nova série de diluições até encontrar o título final. Em nossa experiência com o teste de tria-

gem, o título mais alto encontrado foi em sêro de suíno, para o sorotipo *pomona* (1/409.600).

O método, tal como foi acima descrito, é o usado pelo Autor. Há porém variações que são empregadas por outros laboratórios, sem prejudicar o teste e que em certos aspectos é mais uma questão de gosto pessoal. Assim, há alguns que ainda preferem as placas de porcelana ou de plástico, placas escavadas, e que foram inicialmente usadas quando da idealização do teste. Nós preferimos os tubos. A técnica de diluição é feita por nós usando pipetas de 2 ml graduadas em centésimos. Mas ainda há quem prefira usar a técnica da diluição por gotas trabalhando com uma pipeta Pasteur. Nas diluições usamos uma série geométrica à razão de dois; há pesquisadores que preferem-na à razão de quatro e até de dez. Estes e outros detalhes ou adaptações às condições locais ficam sempre à critério do investigador contanto que não altere a essência do teste.

Durante muito tempo os testes feitos com antígenos vivos foram chamados de "aglutinação-lise" e ainda hoje encontra-se trabalhos em que o termo é empregado. É bom chamar aqui a atenção para o fato de que este termo caiu em desuso e é mesmo considerado como incorreto, desde que inúmeros trabalhos de pesquisa mostraram que não existe na reação a suposta "lise", principalmente nas diluições mais altas. Desta sorte a reação deve ser chamada simplesmente de "sêro-aglutinação microscópica".

c) *Sêro-aglutinação com antígenos formolizados*

O método é idêntico àquele dos antígenos "vivos" com a diferença de que aqui as culturas são formolizadas. Para tanto se adiciona às culturas vivas, 0,3% de formol. Depois de 1 ou 2 horas esta cultura é centrifugada a 1.500 r.p.m. durante 10 minutos para a eliminação de materiais estranhos. Está pronto o antígeno para ser usado. Este é estável por cerca de 2 a 3 semanas e até por 3 meses quando se usa os meios de Korthoff, Stuart ou outro meio contendo sêro de coelho. Apesar da recomendação da O.M.S. sobre o uso de antígenos vivos, este método também pode ser usado. Há porém as vantagens de, na maioria das vezes, dar títulos mais baixos do que aqueles conseguidos quando se usa antígenos vivos, e também de apresentar uma faixa maior de reações cruzadas com sorotipos heterólogos.

d) *Uso do antígeno Patoc*

O método de sêro-aglutinação em que se usa o antígeno *patoc* é o mesmo com variação apenas no antígeno. Em lugar de se usar muitas cepas, usa-se apenas uma, apatogênica, do sorogrupo *semaranga*, cepa Patoc I. A razão disto está na larga faixa de reações cruzadas encontrada em testes comparativos entre a sêro-aglutinação e a fixação de complemento. Nêles, a correlação entre reações feitas com antígeno Patoc somente e antígenos de sorotipos patogênicos, tem sido de 80-83%, havendo citações de até 98,7%. As reações cruzadas se dão principalmente entre o sorotipo *patoc* e os sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *pomona* em maior escala, e outros sorotipos patogênicos em menor grau. Segundo Turner, a correlação é alta quando são usados soros colhidos durante a doença e depois, num período de 9 a 12 meses.

O antígeno *Patoc*, portanto, pode ser usado como antígeno único, principalmente quando não se tem recursos para usar uma grande bateria. É preferível fazer a reação com um antígeno único do que deixar de fazer o diagnóstico. Infelizmente, este antígeno tem aplicação apenas para o diagnóstico de leptospirose humana; com soros de animais êle não reage ou reage muito mal.

e) *Reações de aglutinação cruzada*

É comum o fato de sorotipos pertencentes ao mesmo sorogrupo mostrarem reações cruzadas em altos títulos. Por isto, nunca se deve afirmar que em um caso de leptospirose o antígeno que deu o título mais alto é o mesmo do sorotipo infetante. Acontece ainda casos em que na primeira semana da doença as reações heterólogas são mais fortes do que as homólogas. Elas ocorrem com mais freqüência entre o 6.º e 11.º dias do início da doença o que acontece apenas com alguns sorotipos. Se porém, os testes são feitos com várias amostras de sêro, colhidas em períodos diferentes, a reação homóloga acaba por dominar.

f) *Colheita de material para sorologia*

Ao laboratório deve ser enviado o sêro do paciente, homem ou animal, numa quantidade nunca inferior a 1 ml. Este sêro deve ser livre de contaminações, ser de colheita recente e não estar hemolisado. Se não fôr levado ao laboratório no mesmo dia da co-

lheita deve ser guardado em geladeira ou de preferência em congelador — 20°C. Se fôr enviado a grandes distâncias, deve ser acondicionado em recipiente com gelo sêco. Na impossibilidade de tal cuidado, o recurso é mandá-lo mesmo à temperatura ambiente. É óbvio que o teor de anticorpos, nestas condições, pode diminuir, não chegando porém a desaparecer totalmente. Tanto assim que soros por nós recebidos do norte do país, com uma demora de quatro dias, ainda reagiram com títulos altos.

Pelo menos duas amostras de sangue devem ser tomadas para as provas sorológicas: uma durante a primeira semana da doença (fase aguda) e a outra dez dias ou duas semanas mais tarde para se acompanhar a ascensão do título em casos positivos. Os títulos máximos, em geral, são alcançados na terceira ou quarta semanas.

O sôro-diagnóstico em leptospirose confirma uma infecção presente ou passada, mas como já foi visto, reações paradoxais podem acontecer, de sorte que a determinação do sorotipo infetante somente pode ser dada pelo isolamento e tipificação de leptospiros.

2. Sôro-aglutinação macroscópica

Como ficou visto, os testes de aglutinação microscópica com muitos antígenos são trabalhosos, demorados e requerem a manutenção de um estoque de culturas, além de outras exigências. Por esta razão, fica restrito à rotina de poucos laboratórios.

Para substituí-lo e tornar o diagnóstico mais acessível, mesmo a pequenos laboratórios, vários pesquisadores pensaram em um teste mais simples e menos trabalhoso. Daí surgirem os testes de sôro-aglutinação macroscópica. Nêles, dentre outras, duas técnicas têm sido muito usadas no exterior: a aglutinação em tubo capilar, de Stoener e o teste de aglutinação em placa, de Galton. Em ambos, os antígenos são formolizados.

Dos dois acima mencionados o mais usado atualmente é o da placa, no qual são empregados quatro "pools" de antígenos, contendo cada um três sorotipos diferentes. Os antígenos não são muito difíceis de se preparar, são estáveis e sensíveis. O teste é simples e tem a vantagem de demonstrar anticorpos nos soros de pacientes, mais cedo do que quando se emprega a sôro-aglutinação microscópica. Na fase aguda da doença, observa-se, quando êle é usado, um grande número de reações cruzadas.

Para um exame de infecções passadas e pesquisa de anticorpos residuais é um teste

menos sensível que o microscópico. Por esta razão tem suas limitações quando se quer fazer pesquisa em inquéritos sorológicos.

O antígeno está comercializado pela Difco mas, no Brasil, não se encontra com facilidade, nem mesmo nas casas especializadas.

Nestas partidas comerciais, muitas vezes ocorre o fenômeno de autoaglutinação, mesmo antes do período de vencimento do antígeno. É necessário pois, tomar as devidas precauções.

Resumidamente, o teste é feito da seguinte maneira: do sôro a ser testado dispensa-se, com uma pipeta de 0,2 ml, apenas 0,01 ml do sôro em uma placa de vidro semelhante à que se usa na sôro-aglutinação, para o diagnóstico de brucelose. A esta quantidade dispensada junta-se uma gota do antígeno (uma de cada pool) que contém aproximadamente 0,055 ml e homogeneiza-se com um palito ou um bastão fino de vidro. A placa é, então, colocada em um agitador especial a uma velocidade de 125 r.p.m., durante 4 minutos. Embora a idealizadora do teste insista na necessidade deste equipamento, algumas vezes tivemos oportunidade de fazer a reação sem êle e obter resultados semelhantes, apenas girando a placa na mão durante o tempo acima especificado.

A reação é lida sobre uma caixa com luz ou qualquer luz indireta com fundo escuro. Será *positiva* (+) quando aparecerem grumos bem distintos; *suspeita*, se houver grumos muito finos e *negativa* se a mistura sôro-antígeno permanecer inalterada.

Se fôr obtida uma reação positiva ou suspeita em um ou mais pools, testa-se então o sôro com os antígenos isolados que compõem aquêle pool, usando-se o mesmo método descrito acima. Na leitura, os graus de aglutinação deverão ser anotados como 4+ quando todos os organismos aparecem aglutinados e o sobrenadante claro; 3+ se 75% dêles aparecem aglutinados e assim por diante, tal como o critério adotado para a leitura da reação microscópica.

Se uma reação positiva é obtida em um ou mais antígenos, o sôro é diluído a 1/5 e titulado contra aquêles antígenos. Para esta titulação o sôro diluído é colocado em placa nas quantidades de 0,04, 0,02, 0,01 e 0,005 ml. Uma gota do antígeno é misturada a cada uma destas diluições e lida como foi descrito acima. Se nesta operação ainda não se obteve o título final, dilui-se o sôro a 1/50 e dispensa-se na placa as quantidades anteriormente especificadas e mistura-se em cada uma delas uma gota do antígeno. A leitura é feita como as anteriores.

III — METODOS DE ISOLAMENTO
DE LEPTOSPIRAS

O isolamento de leptospiiras de material humano ou animal não é tão difícil quanto parece e depende apenas de certos cuidados gerais de técnica bacteriológica e de alguns fatores a ela ligados. Assim, a limpeza adequada da vidraria usada é importante, pois nela não deve haver traços sequer de detergentes ou antissépticos. A lavagem, portanto, deve ser cuidadosa. O uso do meio de cultura apropriado e com um pH correto (7,2 a 7,4) é também fator de muita importância, bem como a qualidade do material a semear, e a sua idade; deve ser também de colheita recente e não estar autolizado.

A escolha de material, como fonte de isolamento, depende muito do estágio da infecção, seja em casos de leptospirose humana ou seja animal. Deste modo, durante a primeira semana da doença, na fase de leptospiemia, os materiais ideais para o isolamento são o sangue, nos casos humanos e animais, e órgãos (fígado, rins e baço) se houver morte. Durante a fase de leptospiúria o isolamento deve ser tentado da urina e da cortex renal.

1. *Cultura direta*a) *De sangue*

O sangue venoso deve ser colhido assépticamente durante a primeira semana da doença, se possível no período febril e antes que se tenha administrado antibióticos ao paciente. Deve ser semeado imediatamente após a colheita, se possível na própria cabeceira do doente, em 3 a 4 tubos do meio de Fletcher. Se tiver que ser enviado ao laboratório e já chegar coagulado, aproveita-se o soro para a sorologia e tritura-se o coágulo com um pouco do próprio soro e inocula-se tubos com o meio já referido. Para alguns pesquisadores, anticoagulantes são desnecessários e até prejudiciais. Não temos opinião formada a respeito, pois sempre fizemos semeaduras diretas. Para os que quiserem experimentar o material com anticoagulante, aqueles que o usam recomendam o oxalato de sódio a 1%, na quantidade de 0,5 ml para 5 ml de sangue.

A quantidade de sangue a semear nos tubos de meio é importante, visto que um excesso de sangue poderá inibir o crescimento de leptospiiras. A técnica que usamos é adotada em muitos laboratórios e consiste em

semear-se uma gota de sangue no primeiro tubo de meio, duas gotas no segundo e três gotas nos terceiro e quarto tubos. Quando, por motivos alheios à vontade do técnico, é semeada uma quantidade excessiva de sangue no primeiro ou em um dos quatro tubos, deve-se juntar a êle mais meio de cultura para diluir o excesso ou diluí-lo em mais dois tubos com o meio de cultura.

Êstes, após a semeadura do sangue, devem ser incubados em estufa a 28-30°C durante 30 a 40 dias após o que, serão dispensados se não apresentarem crescimento. Em geral, no meio-sólido de Fletcher êste crescimento se traduz pela formação de um anel, bem visível, de cêrca de 0,5 a 1 cm abaixo da superfície do meio. Há, porém, casos de exceção em que culturas positivas não apresentam êste anel, e outros em que êle pode ser formado também pela presença de bactérias contaminantes. Quando o anel aparece devido à presença de outra bactéria, em geral aparece muito cêdo, no terceiro ou quarto dia após a semeadura e está muito mais próximo da superfície do meio, do que aquêle formado por leptospiiras. O anel de crescimento de leptospiiras aparecerá sempre em todos os repiques desde a cultura primária e poderá permanecer durante períodos muito longos. Mesmo em uma cultura muito antiga êle ainda permanece, o que nem sempre quer dizer que ela ainda esteja viável.

As hemoculturas com anel ou sem êle devem ser examinadas em campo-escuro, uma vez por semana, até serem dispensadas como negativas. Se no exame microscópico elas apresentam leptospiiras devem ser imediatamente repicadas em meios novos, usando-se uma pipeta Pasteur. O resto da cultura primária deve ser guardado, para o caso de se necessitar novos repiques ou inoculação de animais para verificação de virulência da amostra. Para isto o ideal é o cultivo primário, pois repiques sucessivos da amostra diminuem a sua virulência. É lógico que também aqui há exceções. Como exemplo citamos uma cepa de *icterohaemorrhagiae* que mantivemos por quase um ano, com alta virulência para cobaia, apesar de feitos repiques sucessivos.

O crescimento de leptospiiras em culturas primárias é muito variável. Algumas amostras crescem rapidamente. Em alguns isolamentos feitos por nós, leptospiiras foram vistas no meio de cultura no quarto dia após a semeadura do material. Há amostras porém, que crescem vagarosamente, multiplicam-se e logo param o crescimento. Esta

observação é importante, pois às vezes é um fator de perda de culturas recém-isoladas, por falta de repiques secundários.

O método de hemocultura em meio semi-sólido é bastante prático, desde que se tenha o meio à mão. Pode ser feito em qualquer hospital, pelo próprio médico. Após a sementeira os meios devem então ser enviados ao laboratório especializado, mesmo fora da cidade, até pelo correio, preferivelmente por via aérea. Os tubos ou vidros contendo o material semeado devem estar muito bem vedados para que não haja derramamento ou perda do material.

b) *De urina*

O isolamento de leptospiros através de cultura de urina de origem humana ou animal tem sido feito com sucesso, principalmente quando se usa a técnica de diluição da amostra para se evitar, tanto quanto possível, a contaminação. É fato sabido que a urina, em geral, está contaminada com outros microrganismos que interferem no isolamento de leptospiros. A técnica de diluição é simples e pode ser feita em qualquer laboratório consistindo no seguinte: aspirar a urina em seringa estéril, de 2 ml, adaptar uma agulha em idênticas condições e semear uma gôta, sem diluir, em um ou dois tubos com o meio de Fletcher; em seguida, dispensar a urina da seringa, deixando apenas 0,1 ml de urina; aspirar então 0,9 ml de salina normal ou tamponada tendo assim uma diluição de 1/10. Dispensar algumas gotas desta diluição e semear uma gôta em um ou dois tubos com 5 ml de meio de Fletcher. Esta operação repete-se por mais 3 ou 4 vezes. Em animais, já foram isoladas leptospiros de urina, sem cuidados de assepsia, usando-se este método em diluições de 1/10 a 1/1.000.000.

Os tubos semeados com urina são também incubados em estufa, tal como nas hemoculturas, e examinados da mesma maneira. A contaminação secundária em geral aparece no tubo semeado com urina não diluída, ou nas duas primeiras diluições. Nesta urina diluída a contaminação secundária é diminuída e as possibilidades de isolamento de leptospiros são bem maiores.

No homem a coleta pode ser feita de maneira normal, pela micção ou por cateterismo. Nos animais de pequeno porte pode-se usar uma técnica de punção da bexiga, sem nenhum dano secundário.

c) *De líquido céfalo-raquidiano*

Havendo possibilidade de uma colheita do líquido nos primeiros dez dias da doença, êle deve ser semeado de 0,25-0,5 ml em 5 ml de meio semi-sólido ou da maneira como se fez com o sangue. Embora seja possível o isolamento por esta fonte, as possibilidades são bem menores do que pelo sangue ou pela urina.

d) *De materiais de necropsia*

A necropsia deve ser feita o mais cedo possível para se evitar uma invasão bacteriana que virá dificultar o isolamento de leptospiros. Nos pequenos animais aconselha-se um banho em solução de cresol a 10% ou em outro desinfetante. Não sendo isto possível, limpar tôda a região ventral com álcool iodado. Abre-se então o tórax com instrumentos estéreis e, se não tiver sido feita nenhuma cultura em vida, retira-se sangue do coração, com pipeta Pasteur ou com uma seringa estéril e semeia-se. Abre-se também o abdômen com instrumentos estéreis retiram-se amostras de órgãos (fígado, rins e baço) para exame microscópico, inoculação em meios de cultura e em animais. A urina, se houver, deve ser puncionada da bexiga, com seringa e agulha estéreis e semeada conforme já foi descrito anteriormente.

Existem três maneiras de se semear os tecidos nos meios de cultura. Na primeira faz-se um macerado do órgão e uma emulsão com salina estéril de sorte que se tenha uma suspensão de tecido a 10%. Com uma seringa de 2 ml aspira-se cêrca de 1 ml da suspensão e semeia-se três gotas em cada um de dois tubos com o meio de Fletcher. Em seguida dispensa-se o conteúdo da seringa deixando 0,1 ml da emulsão e aspira-se 0,9 de salina tal como se fez para a diluição de urina. Semeia-se uma gôta desta diluição em meio de Fletcher e, se possível, em uma placa com o meio de Cox. Continua-se até completar 3 ou 4 diluições adicionais. A gôta da placa com o meio de Cox é espalhada pela superfície, por meio de uma alça de Drigalski ou uma alça comum. Veda-se depois a placa com esparadrapo ou fita gomada.

Uma outra maneira de se semear o órgão é cauterizar a superfície e inserir nesta área, uma pipeta Pasteur, cortada na extremidade; com esta pipeta no interior do tecido faz-se uma rotação e ao retirá-la, deverá vir uma amostra de tecido, que deve ser semeada imediatamente.

A terceira maneira é comprimir o tecido dentro de uma seringa sem agulha, espreme-lo com o êmbulo e semeá-lo diretamente no meio de cultura.

Embora o fígado e o baço também possam ser utilizados, os rins são os órgãos de eleição para o isolamento de leptospiras.

2. Inoculação de animais de laboratório

Os animais de laboratório são de muita utilidade no isolamento de leptospiras. Algumas vezes têm servido inclusive como meio de manutenção de cepas que não se adaptam bem aos meios de cultura.

Para o isolamento devem ser usados animais jovens, de preferência desmamados. Em nossa rotina de trabalho são usadas cobaias jovens, desmamadas, pesando entre 200 e 250 g. Há laboratórios porém, que aconselham um peso entre 120 e 140 g.

Além de cobaias podem ser usados também os hamsters, numa idade de 21 dias e pesando entre 12-25 g. Coelho jovens (10 dias) e pintos de um dia também podem auxiliar no isolamento de leptospiras.

De todos os animais são os dois primeiros os mais usados em rotina.

a) Cobaias

Devem ser usadas duas para cada amostra de material (urina ou suspensão de rins). Inocular de 0,5 a 1,5 ml por via intraperitoneal. Controlar a temperatura retal a partir do terceiro dia após a inoculação até o décimo dia. Sangrar os animais por punção cardíaca, quando apresentarem 40°C ou temperaturas mais elevadas. Com o sangue, semear tubos com meio de Fletcher, observando os cuidados já descritos.

Algumas amostras não determinam febre em cobaias. Para não se perder a oportunidade de isolá-las, mesmo que as cobaias inoculadas com o material não tenham temperatura, convém sangrá-las no sexto dia após a inoculação, e com o sangue semear o meio de cultura. Aos 30 dias após a inoculação as cobaias podem ser sacrificadas e delas devem ser semeados rins e urina.

b) Hamsters

Usa-se também dois para cada amostra de material. Inocular 0,5 ml por via intraperitoneal e sangrar, por punção cardíaca, com uma seringa de 2 ml e uma agulha fina e curta. O melhor período para a sangria de hamsters inoculados é do 5.º ao

10.º dias depois da inoculação. Os animais podem ser sacrificados aos 21 dias após a inoculação e deles semeia-se os rins em cultura direta.

3. Purificação de culturas contaminadas

Quando as culturas de leptospira estão contaminadas na sementeira primária ou quando as culturas de laboratório se contaminam recorre-se aos seguintes métodos de purificação:

a) Inoculação em animais de laboratório

Usa-se uma cobaia adulta para cada cultura contaminada; inocula-se 1 a 1,5 ml da cultura, por via intraperitoneal. Depois de 10 a 15 minutos sangra-se a cobaia por punção cardíaca e semeia-se de 3 a 4 gotas do sangue em vários tubos com o meio de Fletcher. Na rotina dos nossos trabalhos temos feito a purificação por este método sangrando em dois tempos: 15 e 30 minutos após a inoculação.

b) Diluição e sementeira em placas

Da cultura contaminada fazem-se diluições seriadas, em salina normal ou tampoadas, de 10^{-1} até 10^{-7} . Em seguida, semeia-se as placas com o meio sólido de Cox, 0,1 ml das diluições 10^{-3} até 10^{-7} . Espalha-se o inóculo pela superfície do meio e veda-se as placas com fita de papel gomado; leva-se à estufa a 28-30°C, colocando-as em posição invertida. Em geral, uma semana após, o crescimento se torna visível por colônias de formas muito variadas, desde pequenos pontos, até grandes colônias arredondadas, às vezes unidas, dando o aspecto de nuvens. Estas colônias são subsuperficiais. Delas retira-se um fragmento com a alça de platina e semeia-se em meio de Fletcher ou em um dos meios líquidos. Às vezes é necessário esperar-se cerca de quinze dias para que as colônias apareçam.

c) Filtração

Embora seja um método bastante eficiente não é, porém, acessível a qualquer laboratório, devido à exigência de filtros. As leptospiras podem passar através de membranas de filtros com poros de $0,22 \mu$ de diâmetro. Em uso corrente, na purificação

de culturas, utilizamos o filtro Swinny (Milipore) que é adaptado a uma seringa e de fácil manejo. Com êste filtro podem ser usadas dois tipos de membranas que são as de diâmetro $0,22 \mu$ e $0,45 \mu$. O filtro, quando montado para funcionar, fica com uma extremidade adaptada à seringa e tendo na outra extremidade uma agulha. Pela pressão do êmbolo a cultura atravessa as membranas que retêm a contaminação deixando passar as leptospiros. Êste método deve ser usado sòmente quando a cultura, embora contaminada, esteja muito rica em leptospiros.

IV — TIPIFICAÇÃO

O método convencional para a tipificação de leptospiros compreende duas etapas, envolvendo duas reações sorológicas:

- 1) Sôro-aglutinação cruzada na qual a amostra isolada é enquadrada no sorogrupo;
- 2) Teste de absorção de aglutininas pelo qual a cepa isolada é classificada no sorotipo.

No primeiro teste a amostra desconhecida é usada como antígeno, frente a uma bateria de anti-soros representando todos os sorosgrupos atualmente reconhecidos pela O.M.S. e que são em número de 19.

O teste que se usa é o da sôro-aglutinação microscópica com antígeno vivo. A bateria de anti-soros é a seguinte: *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *canicola*, *ballum*, *pyrogenis*, *butembo*, *autumnalis*, *australis*, *pomona*, *grippotyphosa*, *bataviae*, *tarassovi* e *panama*. Se na reação os resultados com êstes anti-soros forem negativos ou derem um título muito baixo em um dêles, fazemos nôvo teste com uma bateria adicional de anti-soros que pode ser composta dos sorotipos *sejroe*, *cynopteri*, *sentot*, *djasiman*, *celledoni*, *shermani*, *semaranga* e *andamana*.

O esquema de diluições por nós empregado é o mesmo da sôro-aglutinação para diagnóstico, começando com o título de 1/50, dependendo da amostra em estudo. Outros laboratórios variam neste esquema e o fazem começando de 1/10 até 1/3.000 (títulos intermediários de 1/100, 1/300 e 1/1.000).

Em geral a amostra desconhecida reage numa escala de títulos, duas diluições abaixo do título homólogo do anti-sôro e uma diluição acima. Suponhamos que o título homólogo seja de 1/25.600; ela vai reagir

a 6.400 e 12.800. O título final será de 25.600 ou 51.200. Neste caso a cepa em exame pertence ao sorogrupo representado por aquêle anti-sôro.

Pode acontecer que uma amostra em teste reaja com nenhum dos antisoros de sorosôro. Neste caso, novos testes devem ser feitos com anti-soros, contra outros sorotipos pertencentes aos sorosgrupos em questão.

Embora seja fato raro, pode acontecer também que uma amostra em estudo não reaja com nenhum dos anti-soros de sorotipos reconhecidos. Em tal caso a amostra em tipificação é considerada como um nôvo sorogrupo. Os mais recentes exemplos são dos sorosgrupos *shermani*, onde há apenas um sorotipo, do mesmo nome, e *panama* que possui os sorotipos homônimos e *crisobali*.

Desde que se possua os anti-soros necessários a tipificação preliminar pode ser feita por qualquer laboratório de diagnóstico, pois não apresenta nenhuma dificuldade. Todavia, a partir daí, para o teste de absorção de aglutininas, o laboratório precisa ser especializado, pois há necessidade de um estoque muito grande de culturas, praticamente tôdas as reconhecidas atualmente e os correspondentes anti-soros (cêrca de cento e cinqüenta). Por esta razão a maioria dos pesquisadores prefere parar na tipificação preliminar e enviar as amostras para os laboratórios especializados, de preferência os da O.M.S. Mesmo que um laboratório esteja em condições de fazer as absorções e classificar a amostra nos sorotipos, há necessidade de enviá-la aos laboratórios de referência, para uma confirmação dos resultados, quando se tratar de um nôvo sorotipo.

Convém chamar a atenção para o fato de que não se pode dar um resultado de tipificação apenas pela tipificação preliminar, com os resultados de uma sôro-aglutinação cruzada. A complementação da tipificação está na absorção de aglutininas, a qual é indispensável.

b) No segundo teste para tipificação são feitas as reações cruzadas de absorção de aglutininas da amostra. É um teste de comparação das ditas reações cruzadas da amostra desconhecida e seu anti-sôro com anti-soros de cepas de referência de todos os sorotipos reconhecidos no sorogrupo em que ela se tenha classificado.

Os antígenos para o teste de absorção de aglutininas são preparados com culturas que tenham de 4 a 7 dias de crescimento, em meios líquidos (Stuart ou Korthoff). Neste teste há necessidade de grandes quantidades

de culturas. Por esta razão, as sementeiras são feitas em volumes de 500 ml de meio. Usamos para isto garrafas de Roux que, após a sementeira, devem ir à estufa 28-30°C, ficando numa posição inclinada durante todo o período de incubação. À cultura, adiciona-se formol, no último dia de incubação, numa concentração final de 0,5%. Três horas depois centrifuga-se a cultura durante 25 minutos a uma velocidade de 5.000 a 7.000 r.p.m., de preferência em centrífuga refrigerada. Finda a centrifugação despreza-se o sobrenadante e a massa de leptospiras é então resuspensa em 1 a 2% do volume da cultura original, juntando-se salina tamponada e formolada a 0,25%. Este é o antígeno absorvente do qual se juntam 4 partes a 1 parte do anti-sôro diluído a 1/10; homogeneiza-se cuidadosamente esta mistura e leva-se ao banho-maria a 50°C durante 2 horas e depois durante toda a noite a 28-30°C. No dia imediato centrifuga-se a mistura absorvente e o sôro absorvido é testado para a presença de anticorpos homólogos.

Considera-se como completa uma absorção quando na mistura absorvente não aparece nenhuma aglutinação microscópica e quando as aglutininas são completamente removidas pelo antígeno homólogo.

Os testes de aglutinação microscópica com soros absorvidos são feitos com antígenos formolizados e os soros são usados em diluições que vão de 1/100 até 1/25.600. A incubação e leitura são feitas do mesmo modo na sôro-aglutinação de diagnóstico, quando se usa antígenos formolizados.

c) *Interpretação dos resultados do teste de absorção*

“Duas cepas são consideradas como pertencentes a diferentes sorotipos se depois do teste de absorção cruzada com quantidades adequadas de antígenos heterólogos, 10% ou mais do título homólogo permanecem regularmente em cada um dos 2 anti-soros”.

V — APENDICE TÉCNICO

1. *Coloração de esfregaços*

a) *Método de Fontana-Tribondeau*

A) Fixador (Solução de Ruge)

Ácido acético glacial	1 ml
Formol a 40%	2 ml
Água destilada	100 ml

B) Mordente

Tanino	5 g
Água fenicada a 1%	100 ml

C) Solução impregnadora (nitrato de prata amoniacal)

Preparar 100 ml de uma solução de nitrato de prata a 5%. Reservar 5 ml da solução. Aos 95 ml restantes adicionar, gota-a-gota, amônia, com uma pipeta Pasteur até que o precipitado cinzento que se forma, redissolva-se. Adicionar então os 5 ml que se reservou, algumas gotas até que se desenvolva ligeira turvação.

Técnica:

- 1) Esfregaço fino, secagem ao ar.
- 2) Cobrir o esfregaço com o fixador, renová-lo e deixar cerca de 1 minuto.
- 3) Lavar cuidadosamente em água corrente.
- 4) Cobrir com a solução mordente aquecendo até a emissão de vapores.
- 5) Lavar em água corrente e depois em água destilada.
- 6) Cobrir com a solução impregnadora e aquecer até a emissão de vapores, durante 30 segundos.
- 7) Lavar e secar ao ar.

b) *Coloração pela Violeta de Metila*

A) Fixador (Ruge, descrito anteriormente).

B) Mordente (Idem).

C) Solução de violeta de metila fenicada:

a) Violeta de metila (gen-ciana)	14 g
Álcool 96°	100 ml
b) Fenol	5 ml
Água destilada	100 ml

Misturar uma parte da solução *a* e dez partes da solução *b* e filtrar em papel.

Técnica:

- 1) Esfregaço fino, secagem ao ar.
- 2) Cobrir com o fixador durante 2 minutos.
- 3) Lavar em água destilada.

- 4) Cobrir com a solução mordente, aquecer suavemente até a emissão de vapores, durante 30 segundos.
- 5) Escorrer o mordente e lavar em água destilada.
- 6) Cobrir com a solução de violeta de metila fenicada durante 2 ou 3 minutos.
- 7) Lavar rapidamente em água destilada.
- 8) Lavar rapidamente com acetona.
- 9) Secar com papel absorvente. Passar o esfregão rapidamente pela chama para completar a secagem.

c) *Coloração pelo Vermelho Congo*

Colocar uma pequena gota do material a estudar (urina, líquido céfalo-raquidiano, etc.) no centro de uma lâmina e em separado, uma gota do corante Vermelho Congo.

Mistura-se a gota do material, pouco a pouco com o corante, de maneira a formar uma película fina. Deixa-se secar ao ar. Lava-se com algumas gotas de uma solução n/10 de HCl; o preparado toma uma cor azul. Lava-se em água corrente. Volta a cor vermelha e lava-se novamente com HCl, deixando secar.

2. *Soluções Tamponadas*

a) Solução tamponada de Sorensen

Fosfato de sódio (anidro) Na_2HPO_4	8,33 g
Fosfato de potássio (monobásico) KH_2PO_4 .	1,09 g
Água destilada	1.000 ml

pH final 7,6.

b) Solução salina tamponada

Salina fisiológica (0,85%)	1.840 ml
Solução tamponada de Sorensen	160 ml

Distribuir em frascos e autoclavar durante 15 minutos. Verificar o pH final depois da autoclavação, que deve ser 7,5.

3. *Meios de Cultura*

a) Meio de FLETCHER

Peptona	0,3 g
Extrato de carne	0,2 g
Cloreto de sódio	0,5 g

Ágar	1,5 g
Água destilada	920 ml
Sôro estéril de coelho	8-10%

Aquece-se o meio base em banho-maria fervendo até dissolver o ágar. Esterilizar por autoclavação durante 15 minutos a 121°C. Deixar esfriar a 50°C e juntar 8 a 10% de sôro de coelho. Misturar para obter uma solução uniforme. Distribuir assépticamente e inativar o meio total a 56°C por uma hora, no dia do preparo e por mais uma hora no dia seguinte. O pH deve ser entre 7,6-8.

Para prova de esterilidade o meio deve ser incubado a 37°C durante 24 horas, e à temperatura ambiente por mais 24 horas.

b) Meio de STUART

Asparagina	0,132 g
Cloreto de amônio	0,268 g
Cloreto de magnésio	0,406 g
Cloreto de sódio	1,808 g
Fosfato disódico	0,666 g
Fosfato monopotássico	0,087 g
Vermelho fenol	0,01 g
Água destilada	995 ml
Sôro de coelho	8-10%

Esterilizar o meio base da mesma maneira como se fez com o meio de Fletcher. Esfriar a 50°C, juntar o sôro estéril de coelho, misturar uniformemente e distribuir assépticamente. O pH do meio deve ser de 7,3-7,6.

A prova de esterilidade é idêntica à do meio anteriormente descrito.

c) Meio de Cox

Dissolver 2 g de Triptosa ou Tripticase e 10 g de ágar (Difco) em 900 ml de água destilada. Distribuir e autoclavar, podendo depois conservar em meio ambiente. Quando se necessita do meio, aquece-se para fundir o ágar, deixa-se esfriar a 59°C e junta-se assépticamente 10 ml de sôro de coelho e se distribui em placas de Petri. Controla-se para esterilidade como anteriormente.

Nota — Os três meios descritos são preparados comercialmente pela Difco.

d) Meio de KORTHOFF

Peptona de Witte	400 mg
NaCl	700 mg
NaHCO ₃	10 mg
KCl	20 mg
CaCl ₂	20 mg
KH ₂ PO ₄	120 mg
Na ₂ HPO ₄	440 mg
Água destilada	500 mg

Ferver durante 20 minutos a 100°C. Filtrar em papel e distribuir em tubos (5 ml por tubo). Os tubos devem ser aquecidos a 100°C e logo esfriados. Juntar a cada tubo 0,4 ml de sôro de coelho e inativar o meio em banho-maria a 56°C, durante 1 hora a 1 hora e meia. Prova de esterilidade em estufa a 37°C, durante 24 horas.

4. Preparo de anti-soros

Usa-se coelhos normais, pesando entre 3,5 a 4 quilos. As inoculações são feitas na veia marginal da orelha, em doses sucessivas de 1, 2, 4 e 4 ml, com intervalos de 6 dias. O inóculo é feito em meio de Fletcher e deve ser repicado cada dia em que se faz a inoculação. Seis dias após a última inoculação colhe-se uma pequena quantidade de sangue para teste. O título homólogo do sôro deve ser 1/12.800. Faz-se então sangria branca do coelho no dia seguinte. Se o título fôr mais baixo pode-se fazer nova inoculação de mais 4 ml. Ao sôro obtido do coelho se junta um volume igual de glicerina como preservativo e se

conserva em geladeira a 4°C, ou em congelador.

SUMMARY

Laboratory diagnosis of Leptospirosis

The methods used in the diagnosis of Leptospirosis are reviewed, described and evaluated. A technical appendix containing the most important staining methods and culture media is added to the review.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALSTOM, J. M. & BROOM, J. C. — *Leptospirosis in Man and Animals*. Edinburgh, E. & S. Livingston Ltd., 1958.
2. GALTON, M. M.; MENGES, R. W.; SHOTTS Jr., E. B.; NAHMIA, A. J. & HEATH, C. W. — *Leptospirosis. Epidemiology, Clinical Manifestations in Man and Animals, and Methods in Laboratory Diagnosis*. Washington, U. S. Govt. Printing Office, 1962. Public Health Service Publ. n.º 951.
3. KOLOCHINE, B. & MAILLOUX, M. — *Physiologie et Métabolisme des Leptospires*. Paris, Masson, 1962.
4. TURNER, L. H. — Leptospirosis I. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 61:842-855, 1967.
5. TURNER, L. H. — Leptospirosis II. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 62:880-889, 1968.
6. TURNER, L. H. — Leptospirosis III. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 64:623-646, 1970.
7. WHO Group on Leptospirosis — Current problems in leptospirosis research. *Wld. Hlth. Org. Techn. Rep. Ser.*, 380, 1967.
8. WOLFFI, J. W. — *The Laboratory Diagnosis of Leptospirosis*. Springfield, Charles C. Thomas, 1954.

Recebido para publicação em 8-12-1970.

CONTEÚDO DO VOLUME 1

N.º 1 — JULHO/AGOSTO/SETEMBRO, 1970

ARTIGOS ORIGINAIS

Single and multiple transferable drug resistance among clinically isolated <i>Shigella</i> strains — M. R. F. de TOLEDO, M. E. ZULIANI & L. R. TRABULSI	1
Crescimento e viabilidade de <i>Salmonella</i> em diversas variações do meio de RAPPAPORT — D. P. FALCÃO & I. SUASSUNA	13
Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em soros de trabalhadores de diversas profissões — C. A. SANTA ROSA, A. L. COSCINA, A. F. P. de CASTRO, A. S. da SILVA & J. C. QUEIROZ	19
Influence of streptomycin on the production of pyocyanin by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> — F. ALTERTHUM	25
Pesquisa de aflatoxina B-1 e substâncias fluorescentes similares em farinha de trigo — A. PURCHIO	33

MÉTODOS DE LABORATÓRIO

Diagnóstico bacteriológico da tuberculose — L. de ANDRADE	43
---	----

N.º 2 — OUTUBRO/NOVEMBRO/DEZEMBRO, 1970

ARTIGOS ORIGINAIS

Ergosterol biosynthesis in psychrophobic yeasts — M. E. de LIMA, J. ANGLUSTER & L. R. TRAVASSOS	61
Resistance to nine drugs of <i>Shigella</i> strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968 — L. R. TRABULSI, M. E. ZULIANI & M. R. F. de TOLEDO	71
<i>Elytrosporangium spirale</i> : Nova espécie de <i>Actinoplanaceae</i> do gênero <i>Elytrosporangium</i> — J. O. F. de MORAIS	79
Complement fixation test in evaluation of immunity against rabies — O. A. de C. PEREIRA, T. RAPHAELIAN & N. COUTINHO	85

NOTAS

Growth factors for <i>Crithidia fasciculata</i> above 33°C — I. ROITMAN	93
Isolation of three new serotypes of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> — A. F. P. de CASTRO, L. R. TRABULSI, O. CAMPEDELLI Filho & C. TROISE	95

MÉTODOS DE LABORATÓRIO

Diagnóstico laboratorial das leptospiroses — C. A. SANTA ROSA	97
---	----

