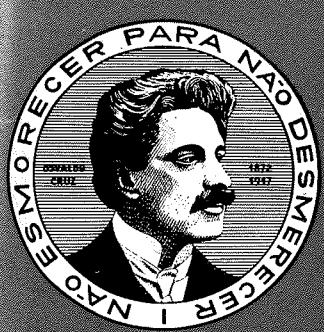


Vol. 2, n.º 3, p. 107-161

1971

REVISTA  
DE  
**MICROBIOLOGIA**



Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo - Brasil

## **Os modernos métodos de análises clínicas têm este símbolo**



Este símbolo identifica a Wiener lab., o maior fabricante de jogos para Diagnósticos da América do Sul.

Elaboramos os melhores produtos para análises clínicas, tendo cada um muitos detalhes exclusivos. Por exemplo, os substratos para determinações enzimáticas, Transaminases GOT e GPT, Fosfatases Alcalina, Ácida e Ácida Prostática. Lacticodehidrogenase e Amilase, são os únicos conhecidos estáveis a temperatura ambiente. Colestat proporciona o único sistema de extração instantânea para a dosagem de Colesterol sérico. Colestat Esteres, permite o fracionamento de colesterol em sómente 30 minutos. Glicemia, dosa glicose verdadeira em 5 minutos pelo método da Orto-toluidina. Uricostat permite determinar ácido úrico mediante uma reação realmente específica. Timol-test se prepara em 1 minuto e dura 1 ano. E assim poderíamos falar de todos os "Kits" para Diagnóstico Wiener que são idealizados para que o trabalho de laboratório possa ser feito mais rápido, mais exato, mais econômico e com a maior segurança.

Atendemos pedidos de muitos países e asseguramos assessoria técnica integral, entrega imediata e estoque permanente.



# **Wiener lab.**

SOLICITE-NOS LITERATURA E TÉCNICAS

Distribuidora Exclusiva para o Brasil



**Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos**

RUA BARATA RIBEIRO, 369 — CAIXA POSTAL 4.022

FONES: 256-0508 — 256-1682 — 256-9848 — 257-1831 — São Paulo, SP

## C O N T E Ú D O

ARTIGOS ORIGINAIS	Pág.
Definición de los habitos alimentares de anofelinos de Guatemala y República Dominicana, por tecnicas de gel-precipitación — I. D. RICCIARDI	107
Ringworm epizootic among laboratory guinea-pigs due to <i>Trichophyton mentagrophytes</i> — O. FISCHMAN & M. A. S. C. PORTUGAL .....	113
Estudo "in vitro" sobre a sensibilidade do <i>Corynebacterium diphtheriae</i> a treze antibióticos — L. C. D. FORMIGA, A. C. P. SILVA, C. A. R. PINHEIRO, R. L. ASSUMPCAO, M. H. SILVEIRA, C. E. V. SERPA & I. SUASSUNA	117
Studies of the hepatitis-associated-antigen (HAA) in patients with viral hepatitis and in "normal" population groups — J. A. N. CANDEIAS .....	129
Estudio inmuno-electrofocal de proteínas plasmáticas — M. A. GUZMAN & E. BARBOSA .....	137
Anti-rabies revaccination in humans. II. Preventive immunization with few doses and the effect of one single booster dose — O. A. C. PEREIRA, A. GODANO, E. L. BOCATO, T. RAPHAELIAN & L. T. M. SOUZA .....	145
 REVISÃO	
Isolamento e caracterização de bactérias filamentosas Gram positivas e aeróbias da cavidade bucal — L. C. BIER & W. C. ARAÚJO .....	149

## 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.

#### P R E C O S

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, 862 — C.P. 20.342  
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.

#### P R I C E S

Single copies .....	US\$ 2,00
Back copies .....	US\$ 3,00
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, 862 — C.P. 20.342  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia  
SÃO PAULO — BRASIL

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A *Revista de Microbiologia* é uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia. Publica trabalhos originais e de revisão 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. Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, rua Botucatu, 862, Caixa Postal 20.342, São Paulo, S. P., Brasil ou a Italo 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, pesos e volumes, os prefixos nano (n) e pico (p) devem ser usados em lugar de milímicro ( $m_\mu$ ) e micromicro ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em nanômetros (nm;  $10^{-9}$  m) ou em micrômetros ( $\mu m$ ;  $10^{-6}$  m), ou ainda, em Angstroms (A;  $10^{-10}$  m). Partes por milhão (ppm), devem ser expressas como microgramos por mililitros ( $\mu g/ml$ ), ou microlitros por litro ( $\mu$  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 fôr 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 secções: 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 secção 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 *World Medical Periodicals*. Citações de resumos, "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 secção 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, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo (exceto a legenda, que deve constar em página separada). 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; devem entrar em entendimento com os Editores da *Revista* quando desejarem maior número, correndo então as despesas por conta própria.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

*Sócios Patrocinadores*

ADAGA S.A. — COMÉRCIO E IMPORTAÇÃO

BIOLAB — PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

CELM — COMPANHIA EQUIPADORA DE LABORATÓRIOS MODERNOS

DIEDERICHSEN THEODOR WILLE — COMÉRCIO INDÚSTRIA S.A.

ELI LILLY DO BRASIL LTDA.

INDÚSTRIAS FARMACÉUTICAS FONTOURA WYETH S.A.

INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÉUTICA SCHERING S.A.

LABORATÓRIO ROCHE — PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÉUTICOS

LABORTERÁPICA BRISTOL S.A. INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÉUTICA

MICRONAL S.A. — APARELHOS DE PRECISÃO

PFIZER QUÍMICA LTDA.

## DEFINICIÓN DE LOS HABITOS ALIMENTARES DE ANOFELINOS DE GUATEMALA Y REPÚBLICA DOMINICANA, POR TECNICAS DE GEL-PRECIPITACIÓN

I. D. RICCIARDI<sup>(1)</sup>

### RESUMEN

Son presentados los resultados relativos a la identificación de la alimentación de 308 ejemplares de *A. albimanus* capturados en la República Dominicana y 360 ejemplares de *A. pseudopunctipennis* colectados en Guatemala, por medio de la técnica de la doble difusión en gel de agar (Ouchterlony), que se presenta em términos generales, como método de ejecución más simple y de resultados más objetivos, que los de la tradicionalmente usada, la técnica de precipitación en tubo capilar.

Los resultados de experiencias llevadas a cabo en laboratório, confirman la posibilidad de la identificación de la alimentación de los artrópodos, en el campo, en sitios de difícil acceso y sin recursos. De igual modo, se indica una técnica que evidencia y resalta la vizualización de las líneas de precipitación formadas en el agar, através de vaporización con ácido acético glacial; son expuestos los datos comparativos entre lecturas hechas antes y después de la vaporización.

En la identificación del contenido sanguíneo del *A. pseudopunctipennis*, fueron encontrados resultados de interés en cuanto a la biología de este insecto, una vez que de todos los ejemplares examinados, sólamente en uno se determinó la presencia de sangre humana, lo que contradice datos existentes en la literatura.

Finalmente, son discutidos los resultados encontrados, con los obtenidos por otros autores, además de la nueva aplicación que ofrece la inmuno-difusión en el campo epidemiológico.

### INTRODUCCION

Em 1914, GÖZONY<sup>6</sup>, intentó, por la primera vez, identificar la sangre ingerida por artrópodos, utilizando la técnica de precipitación en tubo capilar y pruebas de fijación de complemento. Aunque estas experiencias no se orientaran específicamente hacia un estudio epidemiológico y sí, al tiempo de efectividad de las propiedades antigenicas de la sangre ingerida por los mismos, tienen el mérito de haber iniciado este grande campo de investigación.

La identificación de los hábitos alimentares con objetivos epidemiológicos fue realizada, probablemente por primera vez, en 1923, por BULL & KING<sup>3</sup>, durante una investigación sobre la biología de mosquitos vectores de malaria en Louisiana, E.U. usando, igualmente, la prueba de precipitación en tubo capilar. Desde entonces, varios trabajos fueron publicados sobre el asunto destacándose las numerosas contribuciones de WEITZ<sup>13-16</sup>, que además de utilizar la reac-

Parte de la Tesis presentada al Instituto de Microbiologia de la Universidade Federal do Rio de Janeiro, para la obtención del grado de "Mestre" em Microbiologia e Imunologia

(1) Becario de la CAPES (Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Guanabara, Brasil

ción de precipitación en tubo capilar, introdujo la técnica de inhibición de hemoaglutinación, en los casos en que encontraba reacciones cruzadas en la prueba de precipitación.

Además de la precipitación en tubo capilar, otras técnicas fueron descritas para este tipo de investigación, como por ejemplo la de LLOYD & col.<sup>9</sup>, proponiendo la identificación de la sangre ingerida por el artrópodo, a través de microscopía directa de los eritrocitos contenidos en el tubo digestivo y la de GRJEBINE & col.<sup>7</sup>, proponiendo la hemoaglutinación activa.

Más recientemente, CUNNINGHAM & col.<sup>5</sup> utilizaron placas cubiertas de agar donde adicionaron inmuno-sueros para proteínas séricas de diversos animales. Sobre la capa de agar colocaron el contenido sanguíneo ingerido por el artrópodo y observaron la formación del anillo de precipitación alrededor del mismo, presente apenas en los sistemas homólogos.

El presente trabajo tiene como objetivo la aplicabilidad de la gel difusión en la definición de los hábitos alimentares de los anofelinos, según la técnica publicada por RICCIARDI & MELLO<sup>12</sup>, basada en las técnicas de doble difusión de OUCHTERLONY<sup>10</sup>.

Con este proceso, fueron analizados los contenidos sanguíneos de *A. albimanus* capturados en la República Dominicana y de *A. pseudopunctipennis* colectados en Guatemala, tratándose de evidenciar en esta última especie el papel que desempeña en la cadena epidemiológica de la malaria, una vez que la misma es motivo de discusión, en cuanto a su importancia como vector de malaria.

#### MATERIAL Y METODOS

Fueron examinadas las muestras sanguíneas de 668 anofelinos, de los cuales 308 *A. albimanus* de Rep. Dominicana y 360 *A. pseudopunctipennis*, de Guatemala, recibidos por vía aérea y, en la gran mayoría de los casos, como sangre impregnada en papel de filtro. Se efectuaron experiencias con el objetivo de comprobar la efectividad de la técnica, según el estado del contenido digestivo de los mosquitos en estudio, esto es, de mosquitos vivos, de mosquitos muertos o ape-

nas del que se haya impregnado en papel de filtro. En los dos primeros casos se usaron ejemplares de *A. aquasalis*, provenientes del Estado de Guanabara y el contenido sanguíneo se obtenía separando el abdomen del insecto, con la ayuda de una tijera, y puesto el contenido digestivo directamente en el hueco de una placa de microdilución, siendo diluido en 0,05 ml de solución salina al 0,85%. Cuando se realizaba la prueba con la muestra de sangre en papel de filtro, ésta era recortada y diluida en 0,05 ml de la misma solución salina isotónica.

Después de permanecer en refrigerador durante aproximadamente 12 horas, las muestras sanguíneas eran procesadas convenientemente, como lo hemos descrito anteriormente<sup>12</sup>. La lectura era efectuada después de las 24 horas, previa vaporización con ácido acético glacial<sup>11</sup>. Los inmuno-sueros usados en la identificación, fueron preparados según la técnica descrita por WEITZ<sup>13</sup>.

#### RESULTADOS

Los datos referentes a la captura de los ejemplares de *A. pseudopunctipennis* se encuentran en la Tabla I. Estos anofelinos

T A B L A I

Ejemplares de *A. Pseudopunctipennis* estudiados; referencias de captura

Lote N.º	Localidad(*)	Distancia a la fuente de alimentación (Metros)		Nº de ejemplares
		Animal	Humana	
1	Petapilla	200	250	23
2	Iglesias	150	200	5
3	Petapilla	200	250	45
4	Petapilla	200	250	13
5	Petapilla	40	50	19
6	Jocotán	100	200	3
7	Petapilla	40	50	5
8	Petapilla	100	200	6
9	Petapilla	40	50	9
10	Petapilla	15-337	10-250	18
11	Petapilla	40-337	50-250	38
12	Petapilla	40-200	25-250	25
13	Petapilla	40-200	60-250	15
14	Petapilla	40-337	50-250	28
15	La Garita	20	40	108

(\*) Municipio de Chiquimula, Departamento de Chiquimula, República de Guatemala

fueron capturados en sus abrigos naturales, constituidos por puentes de carreteras, cerca de sus criaderos. La localidad donde fueron colectados pertenece al municipio de Chiquimula, Departamento del mismo nombre, en la República de Guatemala, es zona malarígena y el *A. pseudopunctipennis* es encontrado en la misma, con mucha frecuencia. Es considerado vector de malaria en diversos países de la América del Sur, Centroamérica y México; ha sido capturado tanto en el interior de las casas como en abrigos animales y en abrigos naturales. En nuestro caso, la distancia que los mosquitos tendrían que volar, para obtener la sangre humana e animal, necesaria para su alimentación era, prácticamente, la misma; así, aunque los insectos no hayan sido capturados específicamente para esta investigación, el índice de positividad para sangre animal fue bastante elevado, lo que se puede observar en la Tabla II. En la misma tabla se resalta el hecho de que apenas 1 ejemplar contenía sangre humana (lotes 10-14); esto demuestra una mínima tendencia hacia la antropofilia, en contraste con una acentuada zoofilia, marcadamente para el ganado vacuno.

En la Tabla III, se muestran los resultados encontrados en los estudios realizados con el *A. albimanus*. De igual modo que el material obtenido en Guatemala, estos mosquitos fueron capturados en zonas malarígenas de la Rep. Dominicana, aunque poco específicamente para el presente trabajo, pues estaban destinados para pruebas de susceptibilidad hacia el DDT. Algunos ejemplares fueron colocados todavía vivos sobre los discos de papel de filtro, mientras que otros, después de muertos. En la misma tabla obsérvese que el porcentaje de identificación fue de 66,5 y en las parciales, el porcentaje encontrado para ganado bovino (93,1) en contraposición a los encontrados para humanos (2,4 y 1,9), están en completo acuerdo con los datos existentes en la literatura<sup>2</sup>, en cuanto que el *A. albimanus* presenta una tendencia eminentemente zoófila.

En la Tabla IV, son encontrados los resultados de experiencias hechas con el empleo del ácido acético glacial para la lectura de las líneas de precipitación. Obsérvese que tal procedimiento puede, en algunos casos, doblar el porcentaje de positividad (lote 1).

T A B L A II  
Resultados de la identificación del reparto de *A. Pseudopunctipennis*

Lote	Total por lote	Tipo de sangre ingerida								Total de positivos
		Humano	Buey	Cerdo	Caballo	Gallina	Perro	Cerdo(**) y Caballo	Buey(**) y Caballo	
1	23	—	9	2	2	2	—	—	—	16
2	5	—	—	—	1	—	—	1	—	2
3	45	—	14	9	5	1	1	1	—	31
4	13	—	9	—	3	—	—	—	—	12
5	19	—	1	—	6	—	—	—	5	12
6	3	—	1	—	2	—	—	—	—	3
7	3	—	1	—	1	—	—	1	—	3
8	6	—	1	—	1	—	—	—	—	2
9	9	—	4	—	3	—	—	—	—	7
10-14(*)	124	1	...	...	...	...	...	...	...	1(*)
15	108	—	60	—	7	—	—	—	2	69

(\*) Estudiados solamente con suero anti-humano

(\*\*) El mismo insecto tenía sangre ingerida de dos fuentes distintas

T A B L A III

Resultados de la identificación del reproto de *A. Albimanus*

Lote	Total por lote	Tipo de sangre ingerida					Positivos
		Buey	Humano	Buey (*) y Humano	Buey (*) y Perro	Buey y Gallina	
1	96	77	3	4	1	3	88
2	31	28	—	—	—	—	28
3	32	12	—	—	—	—	12
4	64	23	—	—	—	—	23
5	64	41	—	—	—	—	41
6	3	2	—	—	—	—	2
7	18	8	2	—	1	—	11
Totales N. <sup>o</sup> y (%)	308	191 (93,1)	5 (2,4)	4 (1,9)	2 (0,9)	3 (1,4)	205 (66,5)

(\*) El mismo insecto tenía sangre ingerida de dos fuentes distintas

T A B L A IV

Acción del ácido acético glacial en la revelación de líneas de precipitación

Resultados	Lote 1 (63 ejemplares)		Lote 2 (64 ejemplares)	
	Antes	Después de la vaporización	Antes	Después de la vaporización
N. <sup>o</sup> Positivos	20	40	14	23
%	31,7	63,4	21,8	35,9
Negativos N. <sup>o</sup>	43	23	50	41

## DISCUSION

Nuestra contribución evita algunas dificultades encontradas en la técnica de precipitación en tubo capilar, entre las cuales, la diversidad en los resultados de las lecturas, cuando las mismas son hechas por diferentes observadores, la dificultad de visualización de la zona de precipitación, ocasionada por detritos existentes en la muestra sanguínea y, principalmente, el menor espacio de tiempo en que los resultados se mantienen positivos a partir del dia de la obtención de la muestra. Esto significa una menor sensibilidad de la técnica, cuando comparada con la que aquí proponemos, la inmunodifusión en gel de agar. Además, la gel difusión acentúa todavía más, su mayor sensibilidad para este tipo de estudio, cuando las placas son vaporizadas con ácido acético glacial, en seguida a la difusión de los ractivos<sup>11</sup>. Es-

te aspecto positivo de la acción del ácido acético fue confirmado recientemente por KAUFMAN<sup>s</sup>.

Cabe destacar, de igual modo, que la técnica aquí propuesta puede ser ejecutada en el mismo sitio de captura, una vez que la conservación de las placas con agar estén listas para el uso, ésto es simple, siendo suficiente mantenerlas en ambiente húmedo. Tal procedimiento mantiene el material en condición de uso por casi un año.

Los resultados encontrados en los ensayos con *A. pseudopunctipennis* nos llevó a revisar los trabajos, semejantes, realizados anteriormente. Una encuesta patrocinada por la Organización Mundial de la Salud<sup>2</sup> concluyó que este mosquito se alimenta en el hombre con una frecuencia que varía de 10,0 a 50,0%, aunque presenta, algunas veces, comportamiento discrepante; así, en el

Perú, tal frecuencia es de 6,4%, en Colombia de 34,8% y en Bolivia de 61,4%, en insectos capturados intra domiciliarmente. En el análisis de los mosquitos capturados en abrigos animales, la frecuencia de alimentación en el hombre se encuentra en la faja de 9,4%. Este último porcentaje se refiere a insectos obtenidos en los tres países citados, además de México. En este mismo tipo de muestras, cuando los mosquitos fueron capturados en abrigos naturales donde, problemática, la oportunidad de alimentarse tanto en hombre como en animales era equivalente, el porcentaje de alimentación en el hombre se quedó en 50,0%.

En nuestro caso apenas 0,27% de los insectos presentaron sangre humana; considerándose que el sitio de captura era equidistante de los abrigos animales y humanos, obsérvese, por los resultados encontrados que, en los ejemplares examinados, la antropofilia fue mínima. Podríamos pues, especular en el sentido de considerar que en este caso, estaríamos en presencia de una raza diferente, de esta especie, con tendencia eminentemente zoófila. Esta zoofilia es, en parte, concordante con la encontrada en algunos países. En el Perú, el porcentaje encontrado para bovinos (48,1%) fué próxima a la encontrada por nosotros (42,3%); por otro lado, tanto en Bolivia como en Colombia, todavía en relación a los hábitos zoófilos, se ha encontrado una preferencia por el perro (13,4% y 27,7%, respectivamente) mientras que nuestros resultados señalan para este tipo de sangre apenas 0,4%.

En la identificación de la sangre ingerida por ejemplares de *A. albimanus* provenientes de la República Dominicana, nuestros resultados concuerdan con los encontrados en la investigación llevada a cabo por BRUCE-CHWATT & GÖCKEL<sup>2</sup>. Para esta especie, la sangre humana representa menos de 10,0% de la alimentación, siendo pues, una especie preferentemente zoófila. Los porcentajes encontrados por nosotros, con relación a la sangre humana (2,4%) confirman este concepto.

Sobre la preferencia alimentaria del *A. albimanus*, nuestros resultados demuestran que tal inclinación recae sobre bovinos (93,1%). En el Perú y México, la zoofilia es dirigida hacia suinos y ovinos, respectivamente. Tal discordancia sin embargo, debe ser considerada con restriccione, pues los ejemplares usados en nuestros estudios fueron coletados en potreros de ganado vacuno.

En el análisis de todos los ejemplares, no hubo diferencia significativa en los resultados, cuando los insectos llegaban enteros o con el contenido sanguíneo absorvido en papel de filtro.

Otro aspecto importante a ser discutido, es el relativo a los índices de reacciones positivas obtenidas en nuestro trabajo, cuando comparados con los obtenidos por otros investigadores que han utilizado la técnica de precipitación en tubo capilar.

El porcentaje de resultados positivos con mosquitos, es directamente proporcional al tiempo transcurrido entre la alimentación y la obtención de la muestra. En *A. aquasalis*, por ejemplo, mayores por centajes de positividad son obtenidos cuando la sangre es colectada de 12 a 16 horas después de la ingestión; después de 20 horas, tal índice cae a 26,0% y se vuelve nulo pasadas las 40 horas<sup>17</sup>. Además, otros factores, como la temperatura y humedad, tienen influencia sobre la digestión. Este aspecto es muy importante en este análisis comparativo, una vez que los ejemplares por nosotros examinados, no fueron capturados específicamente para el presente estudio. En lo que se refiere al *A. albimanus*, los mosquitos, antes de que sus estómagos fueran pasados a papel de filtro para la muestra de sangre ingerida, eran utilizadas en pruebas de susceptibilidad a insectos y, por esta razón, mantenidos vivos por algunas horas después de la captura, lo que perjudicó, mucho, los porcentajes de positividad en la identificación, habiendo quedado el mismo en 66,5%. Con el *A. pseudopunctipennis* ocurrieron hechos semejantes y el índice de identificación se quedó, coincidentemente, en 66,5%.

Así mismo, estos resultados, cuando comparados con los de otras investigaciones<sup>1, 2</sup>, demuestran que la técnica de gel difusión, cuando aplicada en el estudio de los hábitos alimentares de artrópodos, da resultados altamente satisfactorios.

Llevando en consideración algunos porcentajes parciales, veremos que muchas veces nuestros índices de positividad se aproximan a 100,0% (Tabla II, lote 4; Tabla III, lotes 1 y 2).

#### S U M M A R Y

*Gel-precipitation definition of blood feeding patterns of anopheline trapped in the Dominican Republic and Guatemala*

The double-diffusion technique of gel precipitation, after Ouchterlony, was applied to

the definition of the blood meals of anopheline mosquitoes, namely: *A. albimanus* trapped in the Dominican Republic, and *A. pseudopunctipennis* from Guatemala.

The technique proved reliable and simpler than the customary capillary tube precipitation methods. In addition, a number of weak reactions were improved, or apparently negative results were demonstrated, when the gel preparations were exposed to acetic acid vapor.

The described technique seems well fitted to study specimens from long distance origin, as it is the case in the present investigation, as well as to be employed in the field work, in the less accessible places, since it might be easily performed and kept "in loco".

The blood feeding patterns of the investigated anopheline are discussed, and in contrast with available data, the anthropophilic habits of *A. pseudopunctipennis* was not confirmed.

#### A G R A D E C I M I E N T O S

Agradecemos a los Drs. Milton Thiago de Mello y Moysés A. Fuks por la orientación del trabajo. Agradecemos, de igual modo a los Srs. Daniel Fedulo Monteiro y Edivaldo Alves de Araujo, por la ayuda en la ejecución de la parte práctica del trabajo.

#### R E F E R E N C I A S

1. ARZUBE, R. M. — Investigación de la fuente alimenticia de *T. dimidiata* (*Hemiptera, Reduviidae*), mediante la reacción de precipitina. *Rev. ecuat. Hig.*, 23:137-152, 1966.
2. BRUCE-CHWATT, L. J. & GÖCKEL, C. W. — A study of the blood-feeding patterns of *Anopheles* mosquitoes through precipitin tests. Results of collaborative work for the period 1955-1959 and their application to malaria eradication programmes. *Bull. Org. mond. Santé*, 22:685-720, 1960.
3. BULL, C. G. & KING, W. V. — The identification of blood meal of mosquitoes by means of the precipitin test. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 3:491-496, 1923.
4. CRANS, W. J. — An agar gel diffusion method for the identification of mosquito blood-meals. *Mosquito News*, 29:563-566, 1969.
5. CUNNINGHAM, M. P.; KINBERG, C. D.; BAILEY, N. M. & HARLEY, J. M. B. — Identification of blood meals of blood sucking insects, and their examination for tripanosomal antibodies. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 61:146, 1967.
6. GÖZONY, L. — Serological tests. *J. Hyg. (Lond.)*, 14:354-359, 1914.
7. GRJEBINE, A.; EYQUEM, A. & FINE, J. — Utilisation des hémagglutinines pour l'identification de l'origine spécifique des hématies ingérées par les moustiques hématophages. *Ann. Inst. Pasteur*, 86:741-751, 1954.
8. KAUFMAN, H. S. — Acetic acid for quantitative gel radial immunodiffusion determination. *J. Allergy*, 46:122-124, 1970.
9. LLOYD, L. P. et al — Apud WEITZ, B. — The identification of blood meals in blood sucking arthropodes by the precipitin test. *Bull. Wld Hlth Org.*, 15:473-490, 1956.
10. OUCHTERLONY, O. — Antigen-antibody reactions in gels. *Acta path. microbiol. scand.*, 26:507-515, 1949.
11. RICCIARDI, I. D. — Nova técnica para evidenciar linhas de precipitação formadas em processos de gel difusão. *Ci. e Cult.*, 21:488-489, 1969.
12. RICCIARDI, I. D. & MELLO, M. T. de — Identificação de hábitos alimentares de artrópodos hematófagos, principalmente barbeiros, por meio de provas de imuno-difusão em gel de agar (Ouchterlony). *Rev. bras. Malar.*, 21:597-601, 1969.
13. WEITZ, B. — The identification of blood meal in blood sucking arthropodes by the precipitin test. *Bull. Wld Hlth Org.*, 15:473-490, 1956.
14. WEITZ, B. — Feeding habits of blood-sucking arthropodes. *Exp. Parasit.*, 9:63-82, 1960.
15. WEITZ, B. — Anopheline mosquitoes as vectors of animal malaria in Malaya. *Ann. trop. Med. Parasit.*, 55:180-186, 1961.
16. WEITZ, B. — The feeding habits of *Glossina*. *Bull. Org. mond. Santé*, 28:711-729, 1963.
17. WEITZ, B. & BUXTON, P. A. — The rate of digestion of blood meals of various haematophagous arthropodes as determined by the precipitin test. *Bull. ent. Res.*, 44:445-450, 1953.

Recebido para publicação em 13/5/1971.

## RINGWORM EPIZOOTIC AMONG LABORATORY GUINEA-PIGS DUE TO *TRICHOPHYTON MENTAGROPHYTES*

Olga FISCHMAN (1) & M. A. S. C. PORTUGAL (2)

### SUMMARY

A ringworm infection was verified among guinea-pigs from Instituto Biológico (São Paulo, Brasil) involving 10.0% of the animals. The infection was attributed to a loss of resistance of the animals due to inferior food, environmental conditions and trauma.

Since both healthy and sick animals may serve as reservoirs of *T. mentagrophytes* and transmit the infection to man, a large-scale investigation of incidence of this fungus in animals would be of value.

### INTRODUCTION

*Trichophyton mentagrophytes* (var. granulare) is the cosmopolitan zoophilic dermatophyte which presents the most varied and the widest geographic distribution. It is a common cause of ringworm in man<sup>10</sup>, domesticated<sup>6</sup> wild<sup>13</sup> and laboratory animals<sup>15</sup>. Guinea-pigs seem to be one of the natural carriers of the fungus. Ringworm infections due to *T. mentagrophytes* are recorded all over the world.

In Old World, EVOLCEANU & AVRAM<sup>4</sup> describe an outbreak of ringworm in almost a hundred guinea-pigs from a breeding laboratory in Romania giving the classification of the types of lesions found. JUMINER & STEFANOVIĆ<sup>9</sup> verify an epizootic in Tunis and attribute the contamination to feed. CONNOLE<sup>3</sup> relates the infection in guinea-pigs from the laboratory of the Animal Research Institute of Yeerongpilly, in Australia. MOHAPATRA et al.<sup>15</sup>, in India, give in detail the clinical features of 4 guinea-pigs and morphology and pathogenicity of the isolates.

In New World, MENGES & GEORG<sup>14</sup> study an epizootic which occurred in Georgia, involving 3609 animals of a laboratory. FUEN-

TES & ABOULAFIA<sup>5</sup> recover *T. mentagrophytes* in Cuba from both apparently healthy and from those with lesions. In South America, there are descriptions of ringworm in Argentina, Uruguay and Brasil. NEGRONI<sup>16</sup> records a natural infection in two animals. MACKINNON<sup>12</sup> verifies an epizootic in more than 70.0% of the laboratory guinea-pigs of Instituto de Higiene, in Montevideo. In Brasil, HORTA<sup>8</sup> isolates *T. mentagrophytes* from two guinea-pigs and calls attention to the type and site of lesions. BRANDÃO & CASTRO F.<sup>o</sup><sup>2</sup> describe an outbreak in 10.0% of the animals of Instituto Butantan.

The purpose of this communication is to describe *trichophyton* infection in a colony of guinea-pigs from Instituto Biológico, in April 1970.

### MATERIALS AND METHODS

The breeding group of Instituto Biológico is formed by 2000 guinea-pigs, approximately, which are frequently observed by a veterinarian.

In Autumn 1970, our attention was called to an outbreak of a ringworm infection involving 20 animals of the colony. Crusts,

(1) Departament of Microbiology and Parasitology of the Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brasil  
(2) Veterinarian — Instituto Biológico, São Paulo, Brasil

scales and hairs were plucked off and examined microscopically in KOH 10.0% preparations. Inoculation was made on Mycosel agar (B.B.L.) a room temperature.

For epidemiological purposes, feed was assayed for dermatophytes using human's hair bait<sup>20</sup>.

#### RESULTS

Direct microscopic examination of preparations revealed fungal elements; infected hairs showed a sheath microdes spores around them. Isolates were obtained in pure cultures from all specimen cultivated. The colonies were white to cream in surface color. The reverse side was dull yellowish at the beginning and became red in old cultures. The colonies were powdery.

Macroscopic and microscopic examination revealed the characteristics of *T. mentagrophytes* (var. granulare). The differentiation of *T. mentagrophytes* from *T. rubrum* was accomplished by the urease test<sup>17</sup> and by the mode of hair invasion<sup>1</sup>.

Attempts to isolate dermatophyte from feed were unsuccessful.

No human case was verified, although 5 people handled the guinea-pigs.

#### DISCUSSION

The breeding colony was begun 30 years ago is the sole supply of Instituto Biológico. There was no notice of a prior outbreak occurring before. The animals receive a food of green grass and pellets. They are generally kept clean and in healthy conditions. At the time epizootic occurred the feed was changed to a green grass of a bad quality. The loss of resistance of the animals allied to the climatic conditions (epizootic was verified in Autumn) and natural trauma (verified among these animals, may have been the cause of the origin of ringworm infection, since healthy guinea-pigs may harbor *T. mentagrophytes* (no published data)<sup>5, 7, 11, 18</sup>.

Guinea-pig lesions appeared on the face of the animals, around the eyes, the forehead and the ears, which is the most common site of *T. mentagrophytes* infection<sup>2, 14, 15</sup>. Later on, crusts and scales covered initial lesions (Figure 1). Two animals presented flanks lesions. MENGES & GEORG<sup>14</sup> verified lesions on the legs in a few animals. Human cases in laboratory workers were verified by MACKINNON<sup>12</sup>.



Fig. 1 — Crustous lesion around the eyes of a guinea-pig

In Montevideo, *T. mentagrophytes* ringworm in guinea-pigs was endemic but a veterinarian is currently eradicating the infection. (MACKINNON 1970, personal communication).

Lesions in guinea-pigs tend to heal in 10 to 15 days<sup>2, 15</sup>. In our observations spontaneous healing occurred in 45 days.

Since animals with<sup>2, 3, 4, 6</sup> or without lesions<sup>5, 7, 11</sup> may harbor *T. mentagrophytes* as carriers and transmit it to man, an investigation of this dermatophyte in a survey of animals becomes very important.

#### RESUMO

*Uma epizootia de tinhos em cobaias de Laboratório por Trichophyton mentagrophytes*

Um surto de tinhos em 10,0% das cobaias foi verificado no biotério do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil). A origem foi atribuída à quebra de resistência dos animais, devido ao alimento de qualidade inferior, condições ambientais e traumatismo entre as cobaias.

Desde que animais saudáveis ou doentes podem ser reservatórios de *T. mentagrophytes*, e transmiti-lo ao homem, chama-se atenção para a importância do valor de um inquérito, em grande escala, entre animais.

#### REFERENCES

- AJELLO, L. & GEORG, L. K. — In vitro hair cultures for differentiating between atypical isolates of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyten rubrum*. *Mycopathologia (Den Haag)*, 8:3-7, 1957.

2. BRANDÃO, C. H. & CASTRO F.<sup>o</sup>, A. M. — Tinha epizoótica em cobaias produzida por *Trichophyton gypseum granulosum*. *R. Inst. Adolfo Lutz*, **16**:62-73, 1956.
3. CONNOLE, M. D. — Ringworm in guinea-pigs due to *Trichophyton mentagrophytes*. *Qd. J. agric. Sc.*, **20**:293-297, 1963.
4. EVOLCEANU, R. & AVRAM, A. — Spontaneous trichophytosis of the guinea-pig. The possibility of human infections (in Romanian). *Derm.-Vener. (Buc.)*, **2**:121-129, 1958.
5. FUENTES, C. A. & ABOULAFIA, R. — *T. mentagrophytes* from apparently healthy guinea-pigs. *Arch. Derm.*, **71**:478-480, 1955.
6. GEORG, L. K.; ROBERTS, C.; MENGES, R. & KAPLAN, W. — *Trichophyton mentagrophytes* infections in dogs and cats. *J. Amer. vet. med. Ass.*, **130**:427-432, 1957.
7. GIP, L. & MARTIN, O. — Occurrence of *Trichophyton mentagrophytes* var. asteroid on hairs of guinea-pigs without ringworm lesions. *Acta. derm.-venereol. (Stockh.)*, **44**:208-210, 1964.
8. HORTA, P. — Duas infecções primitivas de cobaias pelo *Trichophyton gypseum asteróides* Sab. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **4**: 120-124, 1912.
9. JUMINER, B. & STEFANOVIC, M. — Epidémie de teigne à *Trichophyton mentagrophytes persicolor* chez le cobaye. *Arch. Inst. Pasteur Tunis*, **40**:125-128, 1963.
10. KAPLAN, W. — Epidemiology and public health significance of ringworm in animals. *Arch. Derm.*, **96**:404-408, 1967.
11. LONDERO, A. T.; FISCHMAN, O. & LOPES, J. O. — Isolamento de *Trichophyton mentagrophytes* de cobaias sãos. *Rev. bras. Pesquisas Med. e Biol.*, **3**:49-50, 1970.
12. MACKINNON, J. E. — Micosis autoctonas de la piel. *An. Fac. Med. Montevideo*, **35**: 53-70, 1940.
13. MARPLES, M. J. — Non-domestic animals in New Zealand and in Rarotonga, as a reservoir of the agents of ringworm. *N. Z. med. J.*, **66**:299-302, 1967.
14. MENGES, R. W. & GEORG, L. K. — An epizootic of ringworm among guinea-pigs caused by *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Amer. vet. med. Ass.*, **120**:395-398, 1956.
15. MOHAPATRA, L. N.; GUGNANI, H. C. & SHIVRAJAN, K. — Natural infection in laboratory animals due to *Trichophyton mentagrophytes* in India. *Mycopathologia (Den Haag)*, **24**:275-280, 1964.
16. NEGRONI, P. — "Trichophyton lacticolor" cultivado en dos casos de tiña espontanea de la cobaya. *Rev. Soc. argent. Biol.*, **8**:7-9, 1982.
17. RAMOS, C. D.; FISCHMAN, O. & LOPES, J. O. — A prova da urease na indentificação do *Trichophyton rubrum* e do *T. mentagrophytes*. *O Hospital*, **78**:1163-1165, 1970.
18. ROSENTHAL, S. A. & WAPNICK, H. — The value of Mackenzie's "hair brush" technic in the isolation of *T. mentagrophytes* from clinically normal guinea-pigs. *J. invest. Derm.*, **41**:5-6, 1963.
19. ROSSETTI, N. — Um novo problema sanitário em São Paulo. *R. Inst. Adolfo Lutz*, **1**:217-303, 1941.
20. VANBREUSEGHEM, R. — Technique biologique pour l'isolation des dermatophytes du sel. *Ann. Soc. belge Méd. trop.*, **33**:173-178, 1952.

Recebido para publicação em 28/5/1971.



## ESTUDO "IN VITRO" SÔBRE A SENSIBILIDADE DO *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE* A TREZE ANTIBIÓTICOS

L. C. D. FORMIGA<sup>(1,2)</sup>, A. C. PERES DA SILVA<sup>(2)</sup>, C. A. R. PINHEIRO<sup>(3)</sup>, R. L. ASSUMPÇÃO<sup>(3)</sup>, M. H. DA SILVEIRA<sup>(3)</sup>, C. E. V. SERPA<sup>(2)</sup> & I. SUASSUNA<sup>(4)</sup>

### RESUMO

Investigou-se a sensibilidade de 30 amostras de bacilos diftéricos frente a 13 antibióticos, considerando-se não sómente aqueles clàssicamente utilizados para o tratamento do estado de portadores de germes, como também antibióticos de introdução mais recente. Em cada caso determinou-se a concentração inibitória e a concentração bactericida mínimas através de técnica de diluição seriada em meio líquido.

Tôdas as amostras testadas foram inibidas por concentrações correspondentes a 2,5 unidades/ml para a penicilina G; 12,5 µg/ml para a oxacilina; 3,1 µg/ml para a ampicilina; 0,4 µg/ml para a cefalotina; 0,08 µg/ml para a eritromicina; 0,16 µg/ml para a espiramicina; 2,5 µg/ml para a lincomicina; 0,016 µg/ml para a rifamicina M; 12,5 µg/ml para a estreptomicina; 0,63 µg/ml para a gentamicina e 2,5 µg/ml para a tetraciclina. Três amostras foram resistentes à concentração máxima utilizada de 25,0 µg/ml de cloranfenicol e uma a 20,0 µg/ml de novobiocina.

Em concentrações que correspondem aos níveis sanguíneos dos antibióticos, observou-se ação bactericida apenas duas vêzes para a penicilina G, 6 vêzes para a novobiocina, 10 para o cloranfenicol, 12 para a lincomicina, 24 para a eritromicina ou para a espiramicina, 26 para a estreptomicina, 29 para a gentamicina e, em todos os casos, com a rifamicina M. Não houve efeito bactericida demonstrável com relação à ampicilina, oxacilina, cefalotina e tetraciclina nas mesmas condições de experiência.

### INTRODUÇÃO

O bacilo diftérico destacou-se como uma das bactérias mais sensíveis à penicilina nos estudos iniciais de FLEMING<sup>11</sup>, o que, no entanto, não correspondeu à expectativa clínica quando o antibiótico foi aplicado "in vivo" no tratamento da infecção<sup>3, 7, 9, 20, 37</sup>, não sendo possível encontrar-se diferenças entre casos agudos tratados exclusivamente com o

sôro antidiftérico e aqueles tratados adicionalmente com o antibiótico. Verificou-se que a penicilinoterapia, em adição à terapêutica antitóxica, não afetou a incidência de complicações ou a mortalidade da doença<sup>5, 7</sup> embora, nesse tipo de tratamento, houvesse sido demonstrado que os bacilos diftéricos tendiam a desaparecer mais precoce-

Serviço de Microbiologia e Imunologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado da Guanabara, com auxílio parcial do Conselho Nacional de Pesquisas

(1) Bolsista da Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

(2) Assistentes

(3) Estagiários

(4) Professor Catedrático. Do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Guanabara, Brasil

mente das vias aéreas superiores quando em comparação com pacientes que apenas haviam recebido soroterapia<sup>2, 5, 7, 8</sup>.

Essas observações, junto à sensibilidade igualmente acentuada do *Corynebacterium diphtheriae* à eritromicina, animaram um número de investigações posteriores, tendo diversos autores registrado uma toxicidade marcadamente menor do processo infeccioso, 48 horas após a administração desse antibiótico<sup>1, 3, 5, 20, 21</sup>. Resumindo as consequências desses estudos, BLAKE<sup>4</sup> admitiu não haver dúvida sobre ser a eritromicina o mais potente antibiótico de uso clínico contra o bacilo diftérico, a fim de eliminar, tão cedo quanto possível, o microrganismo em um paciente. Por outro lado, FLOREY<sup>12</sup>, revendo a literatura disponível, admite que até certo ponto a situação seria idêntica à da penicilina.

Além desses dois antibióticos que persistem como os mais indicados em se tratando de difteria, DURAND & RAZZI<sup>10</sup>, através de um estudo "in vivo", levantam a perspectiva da utilização terapêutica da rifamicina SV. HARNECKER & col.<sup>21</sup>, também com investigação "in vivo", compararam a lincomicina com a eritromicina e BLUTE<sup>5</sup> relata a utilização de clortetraciclina e oxitetraciclina.

No que diz respeito à verificação da sensibilidade "in vitro" do *C. diphtheriae* aos antibióticos, uma certa variabilidade de respostas tem sido apontada, tanto nos dados disponíveis em relação à penicilina<sup>8, 9, 15, 25, 32, 38</sup>, como em relação à eritromicina<sup>15, 16, 20, 22, 31-33</sup>. Parte dessa variação pode ser devido aos diferentes métodos e minúcias de técnicas adotadas, como também refletir a diversidade de origem das amostras, pois pode ser experimentalmente demonstrado um aumento de resistência com o tratamento por penicilina<sup>27</sup>.

O interesse do emprêgo de antibióticos contra o *C. diphtheriae* prende-se não só à sua aplicação em enfermos, como também no controle e eliminação de portadores<sup>28</sup>, onde podem constituir o único recurso disponível. De fato, nesse aspecto assinala-se o êxito principal da aplicação de antibióticos, no que se refere à difteria<sup>12</sup>.

Por tódas essas considerações, no presente trabalho relata-se os níveis de sensibilidade de amostras de *C. diphtheriae* de diversas origens, não só em relação aos antibióticos clássicamente utilizados mas também a outros de introdução mais recente. Uma nota prévia foi anteriormente publicada<sup>13</sup>.

## MATERIAL E MÉTODOS

*Origem das amostras* — Foram estudadas 30 amostras de *Corynebacterium*: 11 amostras foram obtidas de coleções de outros laboratórios, correspondendo a *C. diphtheriae*, amostra Park-Williams 8, do Instituto Butantan, São Paulo, S.P.; duas amostras das variedades "intermedius" e "mitis", do Dr. A. Torres Pereira, Instituto Bacteriológico Câmara Pestana, Lisboa, Portugal; 3 amostras "intermedius", "gravis" e *C. ulcerans*, do Dr. William H. Ewing, "Communicable Disease Center", Atlanta, Georgia e as amostras números 296, 9015, 11049 e 11051, da "American Type Culture Collection", Washington, D.C..

Dezenove amostras foram isoladas no Brasil, sendo 3 no Ceará e 6 na Bahia, recebidas respectivamente do Prof. J. Borges Sales e Dra. Suraya Hagge. As demais amostras (10) foram localmente identificadas, provenientes de pacientes do Rio de Janeiro e da Guanabara.

Tôdas as amostras foram submetidas ao teste de verificação da toxicogenicidade "in vitro", através de uma modificação do teste proposto por ELEK<sup>14</sup>, de acordo com SERPA, ASSUMPÇÃO & PERES DA SILVA. (Modificação do teste de Elek no estudo da virulência do bacilo diftérico. 7.º Congresso da Sociedade de Investigação em Alergia e Imunopatologia do Brasil, São Paulo, 1967). Uma descrição sumária da técnica é apresentada por LIMA & SILVA<sup>29</sup>. Uma amostra, isolada de urina, não mostrou toxicogenicidade "in vitro".

*Técnica de Estudo* — Foram empregados os seguintes antibióticos:

1. Penicilina — "Penicilina G sódica cristalizada" — (Rhodia Ind. Químicas e Têxteis SA)
2. Ampicilina — "Polycillin" — (Laboratórica Bristol SA Ind. Química e Farmacêutica)
3. Oxacilina — "Staficilin" — (Laboratórica Bristol SA Ind. Química e Farmacêutica)
4. Cefalotina — "Kefiin" — (Eli Lilly do Brasil Ltda.)
5. Eritomicina — "Esterato de eritromicina, com potência 600,0 µg/mg" — (Laboratórios Abbott do Brasil Ltda.)
6. Rifamicina — "Rifocina M" — (Laboratório Lepetit SA)

7. Lincomicina — "Standard Powder" — (The Upjohn Co.)
8. Espiramicina — "Rovamicina" base — (Rhodia Ind. Químicas e Têxteis SA)
9. Estreptomicina — "Sulfato de estreptomicina" — (Squibb Ind. Química SA)
10. Tetraciclina — "Reverin" — (Hoechst do Brasil Química e Farmacêutica SA)
11. Gentamicina — "Garamicina" — (Schering SA Ind. Química e Farmacêutica)
12. Cloranfenicol — "Betamicetina" — (Lafi SA Produtos Químicos e Farmacêuticos)
13. Novobiocina — "Albamicina" — (The Upjohn Co.)

A rifamicina foi recebida em solução estabilizada, enquanto a dissolução do esteároto de eritromicina foi realizada em água destilada com a adição de 2,0 ml de "Tween 80" para cada 100,0 mg do antibiótico e aquecimento a 85°C<sup>34</sup>. Todos os demais antibióticos foram dissolvidos em água destilada estéril. A partir da solução concentrada, ajustava-se cada antibiótico para a concentração desejada, utilizando o mesmo meio de cultura a ser empregado nos testes de sensibilidade.

O meio de cultura, baseado no meio proposto por MUELLER HINTON<sup>19</sup>, obedeceu à seguinte composição:

Infuso de coração ...	300,0 g
Bacto "Casamino Acids"	17,5 g
Amido .....	1,5 g
Água destilada .....	1000,0 ml
pH 7,4	

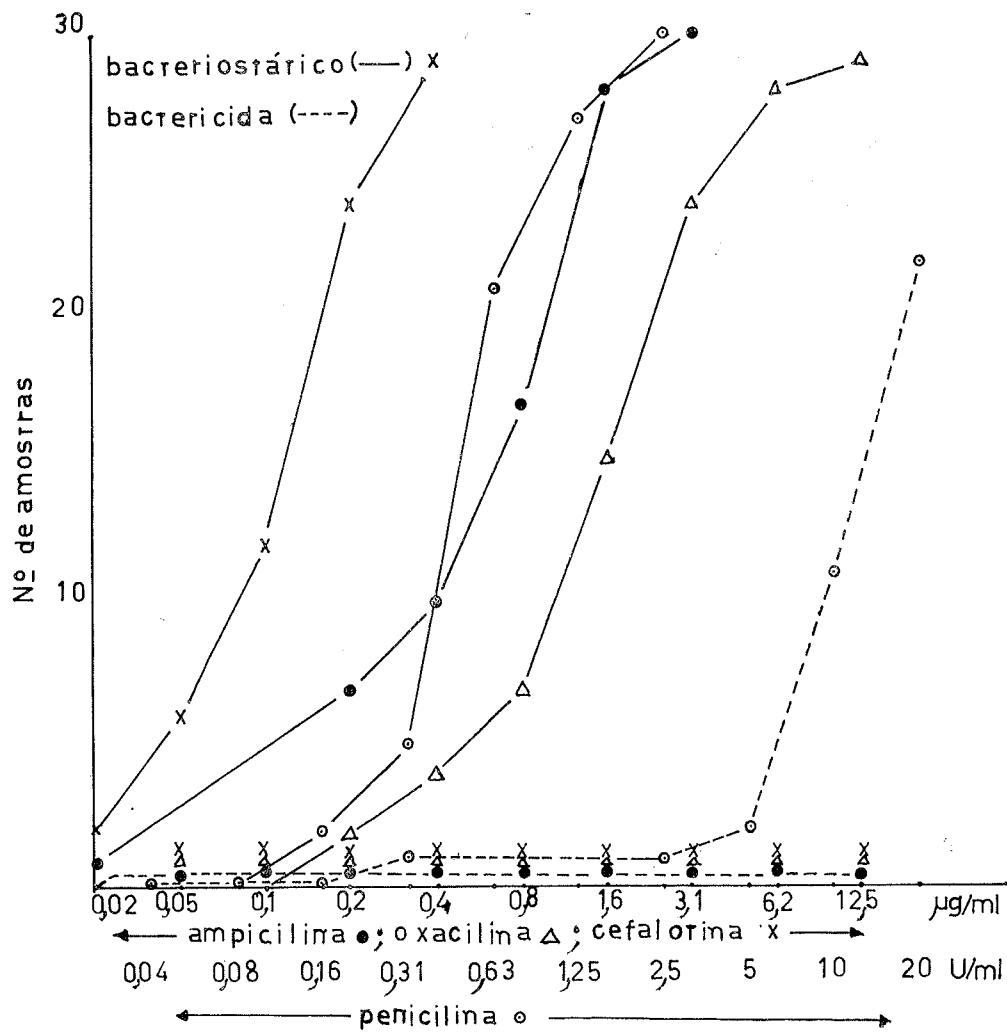


Fig. 1 — Penicilinas e Cefalotina

Na execução do teste foi seguida a técnica descrita por GROVE & RANDALL<sup>19</sup>, utilizando-se 10 concentrações de diluições seriadas em meio líquido e inóculo correspondente a igual volume de diluição a 1/100 do cultivo de cada amostra, com 24 horas, no mesmo meio.

A leitura foi realizada após 24 horas de incubação a 37°C em estufa, anotando-se a presença, ou não, de crescimento. A verificação de atividade bactericida foi feita pela inoculação de uma alça de 4,0 mm de diâmetro, a partir dos tubos que não mostraram crescimento em 24 horas, para novo tubo com 10,0 ml do mesmo caldo.

#### RESULTADOS

Os resultados obtidos para cada antibiótico são apresentados nos gráficos da Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e na Tabela I, que apresenta um sumário de todos os resultados.

Como era de se esperar, o bacilo diftérico mostrou-se sensível à ação da penicilina G

(Figura 1). Cérra de 70,0% das amostras foram sensíveis ao mínimo de 0,63 unidades/ml e 94,0% a 1,25 unidades/ml. Sómente 3 amostras cresceram nessa concentração, mas foram inibidas por 2,5 unidades/ml. A atividade bactericida desse antibiótico, no entanto, não correspondeu à expectativa. Considerado o nível sérico habitualmente atingido com dosagens terapêuticas desse antibiótico, apenas duas, entre as 30 amostras utilizadas, sofreram ação bactericida "in vitro" (Tabela I).

São menos expressivos os resultados que se pode observar com relação aos outros derivados penicilínicos, isto é, a ampicilina e a oxacilina (Figura 1) que não demonstraram efeito bactericida; frequência satisfatória, de resposta bacteriostática, só foi atingida nas concentrações relativamente elevadas de 3,1 e de 12,5 µg/ml, respectivamente. Na ação bacteriostática, a atividade da cefalotina (Figura 1) foi mais acentuada, atingindo a inibição de todas as amostras no nível de 0,4 µg/ml. Não apresentou, contudo, efeito bactericida.

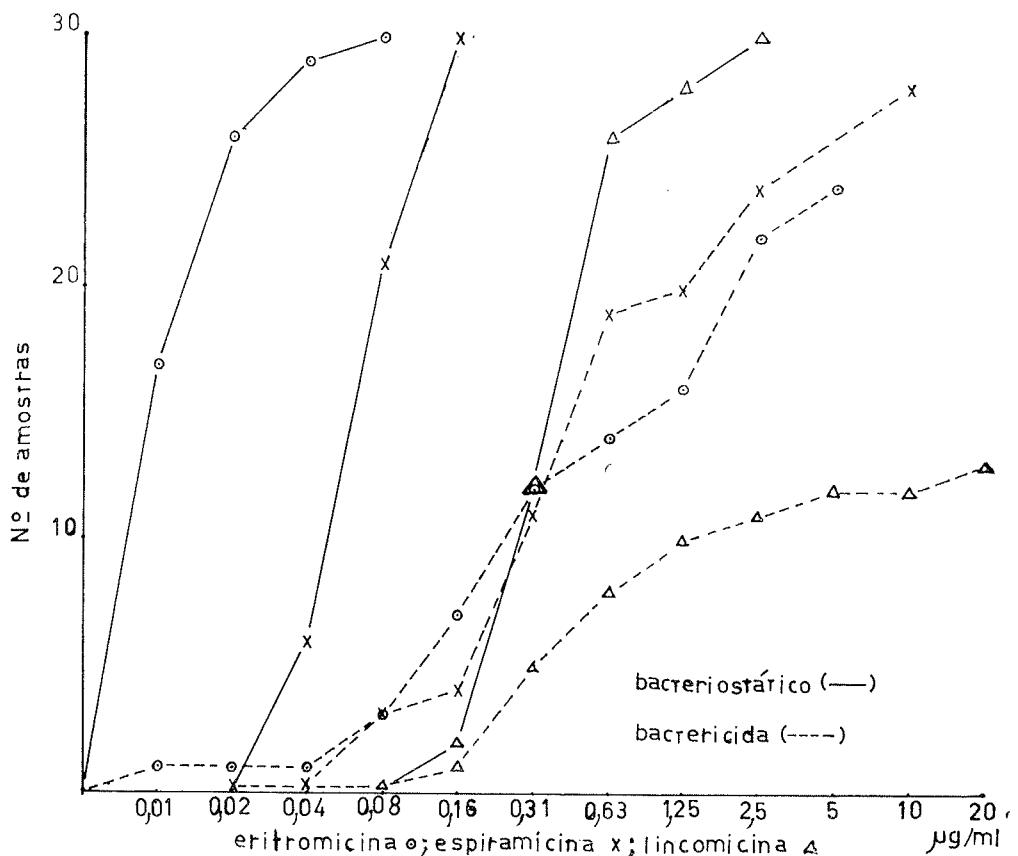


Fig. 2 — Macrolídeos e Lincomicina

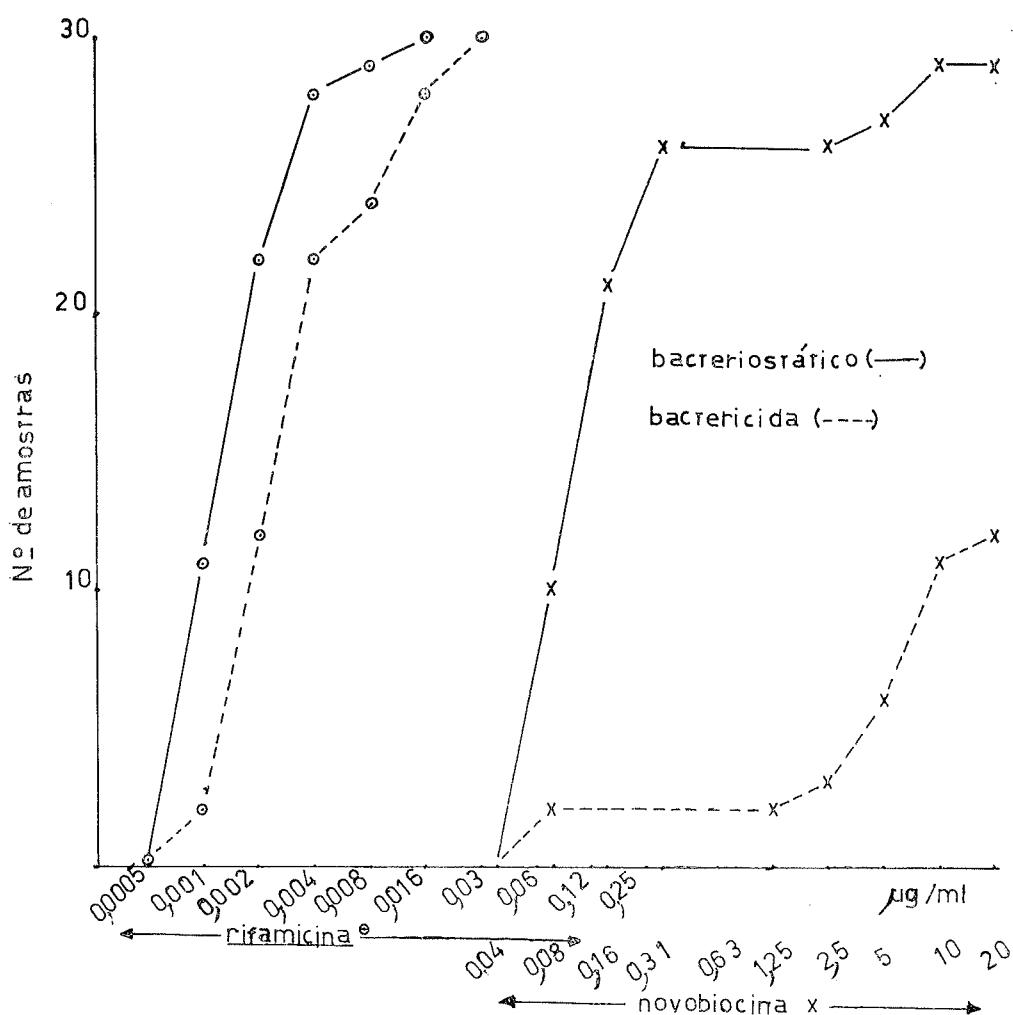


Fig. 3 — Rifamicina e Novobiocina

Os resultados alcançados com a eritromicina (Figura 2) justificam, sem dúvida, a sua tradição nos ensaios clínicos. Mais de 95,0% das amostras foram sensíveis a 0,04  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e a totalidade foi inibida por 0,08  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; a ação bactericida ocorreu sobre 80,0% das amostras, na dose máxima empregada de 5,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Resultados semelhantes são também demonstrados com a espiramicina, um outro macrolídeo. Tôdas as amostras foram inibidas ao nível de 0,16  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e ocorreu quase 70,0% de ação bactericida na dose de 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Na mesma Figura 2, são mais discretos os resultados obtidos com a lincomicina: a concentração inibitória mínima, da ordem de 2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e apenas 43,0% de amostras mortas com 20,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

A Figura 3 apresenta resultados obtidos com a rifamicina M e com a novobiocina. O primeiro destaca-se como o mais eficaz de

todos os antibióticos testados, em termos de concentração inibitória mínima (0,01  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), salientando-se o fato de que um efeito bactericida exerce-se em concentração (0,03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) que acompanha de perto o efeito bacteriostático. Variou acentuadamente a ação da novobiocina. Na concentração de 0,08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  houve inibição de 1/3 das amostras, demonstrando-se efeito bactericida sobre uma delas. No entanto, uma amostra foi resistente ao máximo de 20,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e a moda de distribuição de concentrações bactericidas encontra-se na faixa de 0,31  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Em relação a aminoglicosídeos, a resposta à estreptomicina foi mais variável que à gentamicina (Figura 4). Uma amostra foi sensível à estreptomicina na concentração de 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mas só com 12,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  obteve-se a inibição de tôdas as amostras. A atividade bactericida acompanha, a maior ou menor distância, a concentração inibitória

mínima. Os níveis de inibição com a gentamicina foram mais satisfatórios, atingindo-se a concentração inibitória mínima a 0,63  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . A atividade bactericida foi menos evidente, só sendo alcançada em 20,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para todas as amostras.

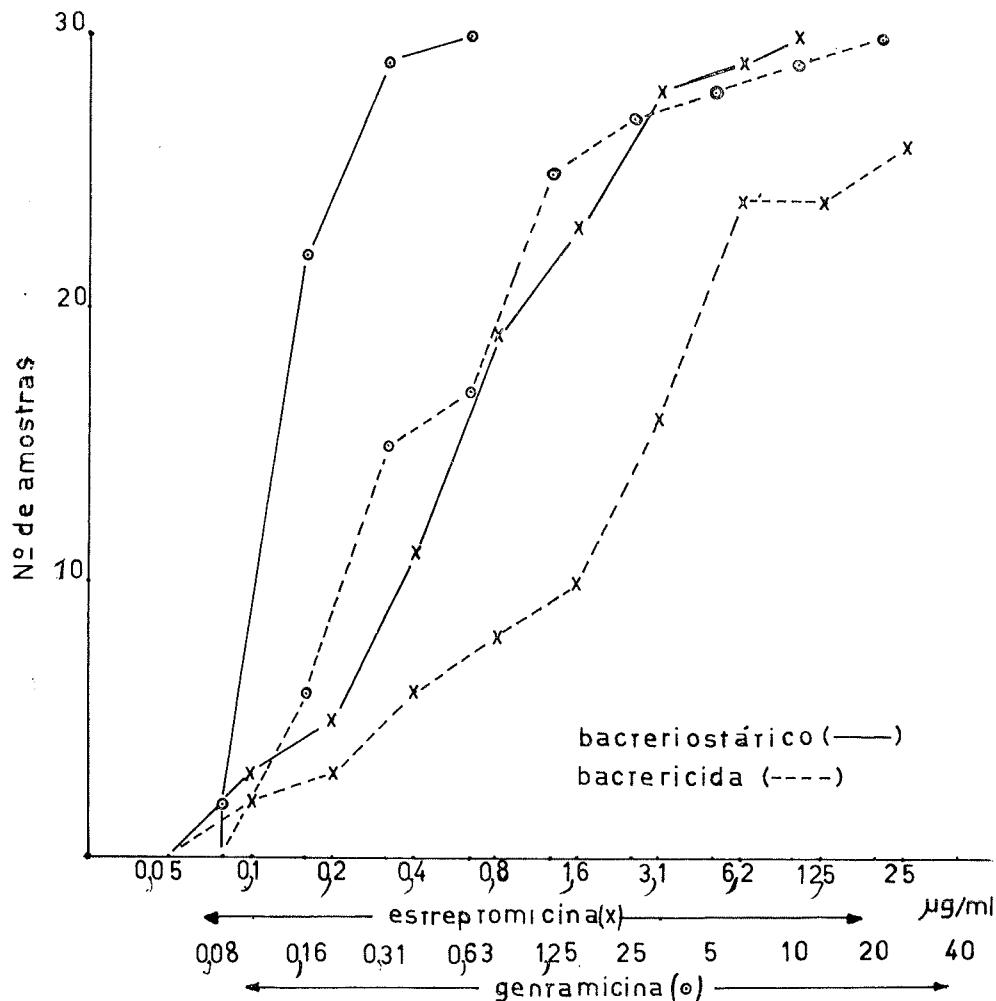
Dos antibióticos de largo espectro (Figura 5), a tetraciclina, ao contrário do cloranfenicol, teria indicação em função da sua concentração inibitória mínima, mas o efeito bactericida foi inexistente, sendo desprezível, em termos de freqüência, no caso do cloranfenicol.

#### DISCUSSÃO

Os dados principais disponíveis sobre a sensibilidade "in vitro" de bactéria diftérica à penicilina, encontram-se condensados na Tabela II. Além dos autores aí referidos, HARNECKER & col.<sup>21</sup> trabalhando com a

técnica de discos impregnados com duas unidades de penicilina, em 13 amostras ensaiadas, encontraram 3 pouco sensíveis e 3 resistentes, ao passo que TAMPIERI<sup>35</sup> relata 80 amostras muito sensíveis ao mesmo antibiótico.

No presente trabalho, as amostras consideradas revelaram-se sensíveis ao antimicrobiano referido. Ressalvada a extrema sensibilidade observada por YOUNG & MOOD<sup>38</sup>, os resultados, dentro de uma faixa aceitável de variação, aproximam-se dos relatados pelos demais autores num período que atinge mais de 20 anos. É relevante constatar que para todas as amostras, a concentração inibitória mínima de penicilina encontra-se nos limites impostos pelos níveis sanguíneos habitualmente atingidos pelo antibiótico (Tabela I), ao passo que concentrações bactericidas só se encontram dentro desses limites em apenas duas amostras, entre as 30 estudadas.



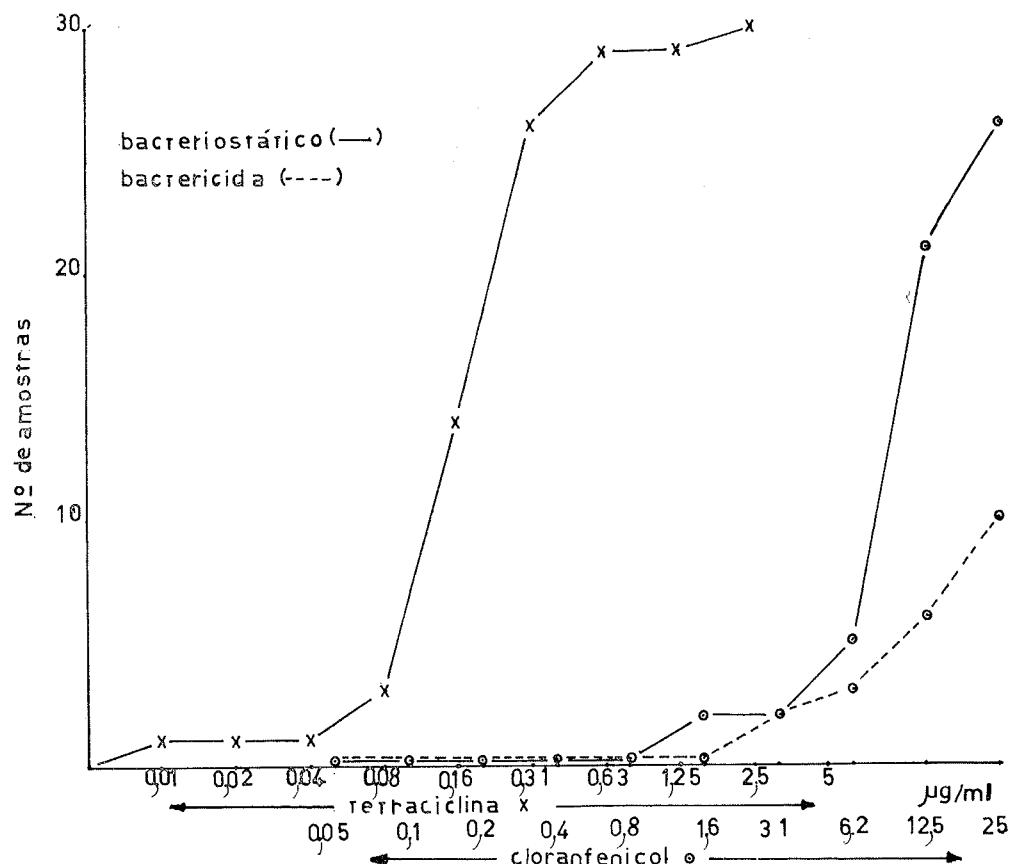


Fig. 5 — Largo Espectro

T A B E L A I

Ação bacteriostática e bactericida de 13 antibióticos sobre o *Corynebacterium diphtheriae*

Antibióticos	N.º de amostras testadas	Tipo de resposta de acordo com o nível sérico em doses terapêuticas			Ação bactericida N.º de amostras	Nível sérico considerado e referências
		S (*)	MS (*)	R (*)		
Penicilina G	30	30	0	0	2	1-5 unidades/ml <sup>30</sup>
Ampicilina	30	17	13	0	0	1-5 µg/ml <sup>30</sup>
Oxacilina	29	15	9	5	0	1-5 µg/ml <sup>30</sup>
Cefalotina	29	29	0	0	0	5-10 µg/ml <sup>18</sup>
Eritromicina	30	30	0	0	24	2-5 µg/ml <sup>26</sup>
Espiramicina	30	30	0	0	24	1-3 µg/ml <sup>30</sup>
Lincomicina	30	30	0	0	12	4-6 µg/ml <sup>17</sup>
Rifamicina	30	30	0	0	30	1-4 µg/ml <sup>30</sup>
Estreptomicina	30	30	0	0	26	15-25 µg/ml <sup>26</sup>
Gentamicina	30	30	0	0	29	5-10 µg/ml <sup>18</sup>
Cloranfenicol	29	21	5	3	10	15-25 µg/ml <sup>26</sup>
Tetraciclina	30	30	0	0	0	10-20 µg/ml <sup>26</sup>
Novobiocina	30	26	1	3	6	1-5 µg/ml <sup>26</sup>

(\*) S = Sensível; MS = Moderadamente sensível; R = Resistente

Em relação a outras penicilinas, os dados da literatura são muito reduzidos ou não foram encontrados. Os presentes resultados, todavia, revelam nítida superioridade da penicilina G sobre a oxacilina e a ampicilina. De outra parte, quanto ao grupo relacionado das cefalosporinas, os dados relativos à cefalotina estendem e confirmam as observações de BONIECE & col.<sup>6</sup> e de HERRELL & col.<sup>23</sup>, verificando-se concentrações bacteriostáticas situadas em níveis muito abaixo daquele esperado no sôro.

A Tabela III relaciona os achados de diversos autores com respeito à eritromicina. Parece evidente que os dados de HAIGHT & FINLAND<sup>20</sup> se afastam dos encontrados neste ensaio, estando os demais autores em concordância, mesmo se levarmos em consideração as duas amostras resistentes a 1,0 µg/ml encontradas por MELO & SANTOS<sup>32</sup>. Por outro lado, no que diz respeito às observações clínicas, BLAKE<sup>3</sup>, tratando 3 portadores penicilino-resistentes, conseguiu em dois a três dias a erradicação do germe e

T A B E L A II  
Atividade "in vitro" da penicilina sobre o bacilo diftérico

Autores	Técnica de diluição	Número de amostras	Conc. inibit. mínima: Unidades/ml	
			Faixa de sensibilidade	Sensibilidade média ou % de sensíveis
Young & Mood <sup>38</sup>	Caldo	6	0,003 — 0,061	0,0305 Unidades
Buxbaum & col. <sup>3</sup>	Caldo	235	0,251 — 1,000	72,0 %
Cruickshank & col. <sup>9</sup>	Caldo	284	0,030 — 1,000	0,2 Unidades
Jackson & col. <sup>25</sup>	Ágar	41	0,200 — 0,800	86,0 %
Frost & col. <sup>15</sup>	Ágar	3	0,090 — 0,390	—
Melo & Santos <sup>32</sup>	Caldo	43	< 1,0	77,0 % (*)

(\*) 10 amostras resistentes a 1 unidade/ml

T A B E L A III  
Atividade "in vitro" da eritromicina sobre o bacilo diftérico

Autores	Técnica de diluição	Número de amostras	Conc. inibit. mínima: µg/ml	
			Faixa de sensibilidade	Sensibilidade média ou % de sensíveis
Haight & Finland <sup>20</sup>	Ágar	12	0,39 — 3,12	1,56
McGuire & col. <sup>31</sup>	Caldo	1	—	0,02
Fusillo & col. <sup>36</sup>	Caldo	5	0,01 — 0,10	0,06
Powell & col. <sup>33</sup>	Ágar	2	—	0,06
Frost & col. <sup>15</sup>	Ágar	3	—	0,09
Melo & Santos <sup>32</sup>	Caldo	46	< 1,0	96,00% (*)

(\*) Duas amostras resistentes a 1,0 µg/ml

resultados idênticos foram obtidos pelos próprios HAIGHT & FINLAND<sup>20</sup>, em apenas um dia de tratamento.

Resultados bastante aproximados dos da eritromicina foram observados com a espiramicina, o outro macrolídeo testado, o qual, ressalvadas considerações de ordem farmacológica, pode considerar-se, na base da experiência "in vitro", como alternativa válida para a indicação da eritromicina. Um outro antibiótico, não considerado no mesmo grupo dos macrolídeos, mas cuja semelhança de atividade com a eritromicina tem sido demonstrada tanto "in vitro" como "in vivo"<sup>21, 24</sup>, é a lincomicina. Essa semelhança se torna também evidente nos presentes ensaios. A lincomicina revelou concentrações inibitórias mínimas, para todas as amostras abaixo do nível médio sanguíneo, distanciando-se dos macrolídeos, sobretudo pela menor atividade bactericida (Figura 2 e Tabela I).

Um ponto de destaque nas presentes investigações parece corresponder à ação "in vitro" da rifamicina M, sobre a espécie bacteriana considerada. Esse antibiótico mostrou-se o mais eficiente, tanto em termos de concentração inibitória mínima, como em relação à atividade bactericida que a acompanha de perto. Afara as observações de VERNÁ<sup>36</sup> que relata uma amostra sensível a 0,01 µg/ml de rifamicina SV, não foi encontrada outra referência sobre a atividade "in vitro" das rifamicinas sobre o bacilo diftérico. DURAND & RAZZI<sup>10</sup>, no entanto, relatam que em 16 portadores e em 16 pacientes com bacilos diftéricos, tratados com rifamicina, obteve-se a negativação bacteriológica entre um a cinco e entre um a quatro dias, respectivamente.

Em relação aos amino-glicosídeos, (Figura 4) parecem também muito satisfatórios os resultados obtidos no presente trabalho. JACKSON & col.<sup>23</sup> observaram 83,0% de 45 amostras de bacilos diftéricos, sensíveis à estreptomicina, na faixa entre 3,1 a 6,3 µg/ml. A concentração inibitória mínima correspondeu a uma faixa mais ampla na nossa experiência, mas dentro de níveis admitidos como de sensibilidade. Nas mesmas condições, foi satisfatória a atividade bactericida exercida sobre 26 entre 30 amostras. Esses resultados são ligeiramente superados pela gentamicina que, de fato, após a rifamicina, mostrou-se o antibiótico de maior atividade "in vitro", mostrando-se bactericida para 29 das 30 amostras testadas (Tabela I).

Dos antibióticos de largo espectro (Figura 5), a atividade bacteriostática da tetr-

ciclina pode ser considerada boa, principalmente se se considera que níveis séricos, 4 a 8 vezes mais altos que a concentração inibitória mínima, podem ser obtidos com doses terapêuticas (Tabela I). Nesse sentido os presentes dados se assemelham aos referidos por JACKSON & col.<sup>23</sup>. Em que pese a ausência de atividade bactericida desse antibiótico, BLUTE<sup>5</sup> relata, com o seu emprêgo, a eliminação do bacilo diftérico, após 3 a 4 dias de tratamento. Por outro lado, foram pobres os resultados presentes em relação ao cloranfenicol e não concordam com os descritos por JACKSON & col.<sup>23</sup>. Esses autores observaram 92,0% de amostras sensíveis na concentração de 6,0 µg/ml, sendo de apenas 17,0% a percentagem por nós observada nas mesmas condições. Ressalta-se, além disso, que 3 de nossas amostras (10,0%) foram resistentes à mais alta concentração do antibiótico usada no presente trabalho.

Finalmente, em termos de comparação, foram pouco promissoras as observações com a novobiocina (Figura 3), sendo apenas ligeiramente melhores que as relativas ao cloranfenicol. No caso de um ou outro antibiótico, não são animadoras as perspectivas da utilização clínica para o tratamento de pacientes e portadores do bacilo diftérico.

#### S U M M A R Y

"In vitro" sensitivity of *Corynebacterium diphtheriae* strains to thirteen antibiotics

The sensitivity of 30 strains of *diphtheria* bacilli to 13 antibiotics was investigated by determining the minimal inhibitory and the minimal bactericidal concentrations in serial broth dilutions of the therapeutic agents.

The totality of the tested strains was inhibited by concentrations of antibiotic reaching 2.5 units/ml of penicillin G; 12.5 µg/ml of oxacilin; 3.1 µg/ml of ampicillin; 0.4 µg/ml of cephalothin; 0.08 µg/ml of erythromycin; 0.16 µg/ml of spiramycin; 2.5 µg/ml of lincomycin; 0.016 µg/ml of rifamycin M; 12.5 µg/ml of streptomycin; 0.63 µg/ml of gentamycin and 2.5 µg/ml of tetracycline. Three strains were found resistant to 25.0 µg/ml of chloranphenicol and one to 20.0 µg/ml of novobiocin.

At concentrations of therapeutic significance a bactericidal effect was observed only twice with penicillin G, 6 times with novobiocin, 10 with chloramphenicol, 12 with lincomycin, 24 with either erythromycin or spiramycin, 26 with streptomycin, 29 with gentamycin and in every case with rifamy-

cin. No bactericidal action was demonstrated in relation with ampicillin, oxacillin, cephalotin and tetracyclin, in the same experimental conditions.

#### A GRADECIMENTOS

Aos estudantes estagiários Lúcio B. Collares e Evelyn Ersenstein e ao preparador Sr. Cláudio de Souza Crespo, pela ajuda em tarefas laboratoriais.

Somos igualmente gratos ao Prof. José Rodrigues Coura, pela sugestão do presente trabalho.

#### REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANNOTATIONS — Erythromycin in diphtheria. *Lancet*, ii:856, 1954.
2. BIXBY Jr., E. W. — The effectiveness of penicillin in the treatment of nasopharyngeal diphtheria. *Amer. J. med. Sci.*, 215: 509-513, 1948.
3. BLAKE, J. C. — Erythromycin in diphtheria. *Lancet*, ii:1023, 1954.
4. BLAKE, J. C. — Erythromycin and diphtheria. *Lancet*, ii:1277, 1962.
5. BLUTE Jr., J. F. — Use of erythromycin in diphtheria. *New Engl. J. Med.*, 251:70-71, 1954.
6. BONIECE, W. S.; WICK, W. E.; HOLMES, D. H. & REDMAN, C. E. — "In vitro" and "in vivo" laboratory evaluation of cephalothin, a new broad antibiotic. *J. Bact.*, 84: 1292-1296, 1962.
7. BRUYN, H. B.; BRAINERD, H. & LEPPA, B. W. — Penicillin in the treatment of diphtheria. *Amer. J. med. Sci.*, 219:408-413, 1950.
8. BUXBAUM, L.; NENNER, N. & DOLGOPOL, V. B. — Penicillin and sulfadiazine sensitivity of 385 strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bact.*, 53:507, 1947.
9. CRUICKSHANK, R.; GILLESPIE, E. H.; GOLDIE, W. H.; HARRIS, H. J.; JEBB, W. H. H.; KING, C. J. G.; MARTIN, P. H.; PARKER, M. T. & MACDONALD, A. — Penicillin in diphtheria. Report of a subcommittee of the Public Health Laboratory Service. *Lancet*, ii:517-519, 1948.
10. DURAND, P. & RAZZI, A. — Rifamicin in diphtherial infection. *Chemoterapia*, 7:612-616, 1963.
11. FLEMING, A. — Histórico e desenvolvimento da penicilina. A penicilina e suas aplicações práticas. Tradução brasileira do original inglês: Penicillin, its practical application. São Paulo, Instituto Progresso Editorial, 1947, p. 11-42.
12. FLOREY, M. E. — *The clinical application of antibiotics*. London, Oxford University Press, 1960. V. IV, 303 p.
13. FORMIGA, L. C. D.; SILVA, A. C. P. da; SERPA, C. E. V.; PINHEIRO, C. A. R.; ASSUMPÇÃO, R. L.; SILVEIRA, M. H. da; COLLAES, L. B. & SUASSUNA, I. — Sensibilidade do bacilo diftérico a diferentes antibióticos. *An. Microbiol. (Rio de J.)*, 16:238, 1969.
14. FROBISHER Jr., M. — *Fundamentals of Microbiology*. 5th ed. Philadelphia & London, W. B. Saunders Co., 1953. 633 p.
15. FROST, B. M.; VALIANT, M. E.; MCLELLAND, L.; SOLOTOROVSKY, M. & CUCKLER, A. C. — The antimicrobial activity of cathomycin, a new antibiotic. *Antibiot. Ann.*, 1955-1956:918-923, 1956.
16. FUSILLO, M. H.; NOYES, H. E.; PULASKI, E. J. & TOM, J. Y. — Antimicrobial spectrum and cross resistance studies of erythromycin and carbomycin. *Antibiot. and Chemother.*, 3:581-586, 1953.
17. GARROD, L. P. & O'GRADY, F. — *Antibiotic and Chemotherapy*. 2nd. ed. Edinburgh & London, E. & S. Livingstone. 1968. 475 p.
18. GOODMAN, L. S. & GILMAN, A. — *As bases farmacológicas da terapêutica*. Tradução brasileira do original inglês: The pharmacological basis of therapeutics. 3.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan. 1967. p. 1596.
19. GROVE, D. C. & RANDALL, W. A. — Assay of antibiotics. *A laboratory manual*. New York, Medical Encyclopedia Inc. 1955. 238 p.
20. HAIGHT, T. H. & FINLAND, M. — Laboratory and clinical studies of erythromycin. *New Engl. J. Med.*, 247:227-232, 1952.
21. HARNECKER, J.; GILABERT, B.; CONTRERAS, J.; UBILLA, V.; GOLDENBERG, G. & SANZ, A. — Estudio clínico-bacteriológico preliminar de un nuevo antibiotico: lincomicina. *Rev. chil. Pediat.*, 34:522-528, 1963.
22. HEILMAN, F. R.; HERRELL, W. E.; WELLMAN, W. E. & GERACI, J. E. — Some laboratory and clinical observations on a new antibiotic, erythromycin (Flotycin). *Proc. Mayo Clin.*, 27:285-304, 1952.
23. HERRELL, W. E.; BALOWS, A. & BECKER, J. — Some experimental and clinical studies on cephalothin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 4:709-719, 1963.
24. HUBINGER, M. G. von.; SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I. R. & OLIVEIRA, L. de A. — Sensibilidade de *Streptococcus* e *Staphylococcus* de diferentes grupos sorológicos e bacteriofágicos à lincomicina: resistência de bactérias Gram-negativas de infecções urinárias. *O Hospital*, 69:691-699, 1966.
25. JACKSON, G. G.; CHANG, S. M.; PEACE, E. H. & FINLAND, M. — Sensitivity of diphtheria bacilli and related organisms to nine antibiotics. *J. Pediat.*, 37:718-726, 1950.

26. JAWETZ, E.; MELNICK, J. L. & ADELBURG, E. A. — *Manual de Microbiologia Médica*. Tradução brasileira do original inglês: Review of medical microbiology. Rio de Janeiro, Editôra Guanabara Koogan, 1968. 519 p.
27. KUNIKA, E. & RUSZCZYK, K. — Behavior of *C. diphtheriae* in relation to penicillin. *Med. dos w. Mikrobiol.*, 14:27-37, 1962.
28. LEVY, A. J. — Local treatment of carrier of virulent diphtheria with penicillin. *J. Amer. med. Ass.*, 136:855-857, 1948.
29. LIMA, O. A. & SILVA, W. D. da — *Imunologia, Imunopatologia, Alergia. Métodos*. Rio de Janeiro, Editôra Guanabara Koogan, 1970. p. 312-314.
30. LORIAN, V. — *Antibiotics and chemo-therapeutic agents in clinical and laboratory practice*. Springfield, Charles C. Thomas. 1966. 237 p.
31. MCGUIRE, J. M.; BUNCH, R. L.; ANDERSON, R. C.; BOAZ, H. E.; FLYNN, E. H.; POWELL, H. M. & SMITH, J. W. — "Ilotycin" a new antibiotic. *Antibiot. and Chemother.*, 2:281-283, 1952.
32. MELO, S. M. de & SANTOS, E. G. T. dos — Sensibilidade do bacilo diftérico "in vitro" à penicilina. *O Hospital*, 66:893-898, 1964.
33. POWELL, H. M.; BONIECE, W. S.; PITTINGER, R. C.; STONE, R. L. & CULBERTSON, C. G. — Laboratory studies on "Ilotycin". *Antibiot. and Chemother.*, 3: 165-182, 1953.
34. SILVEIRA, M. H. da; SUASSUNA, I.; PINTO, C. A. M. & VALEIRO, J. F. — Ação "in vitro" do estearato de eritromicina sobre *Shigella* e grupos enteropatogênicos de *Escherichia coli*. *O Hospital*, 75:1913-1926, 1969.
35. TAMPIERI, A. — Observations on the "in vitro" activity of 33 different chemotherapeutic drugs and antibiotics against *Corynebacterium diphtheriae*. *Boll. Inst. sieroter. milan.*, 41:175-195, 1962.
36. VERNA, L. C. — Rifamicina SV. Estudio de su actividad antimicrobiana "in vitro". *Día méd.*, 34:2614, 1962.
37. WEINSTEIN, L. — The treatment of acute diphtheria and the chronic carrier state with penicillin. *Amer. J. med. Sci.*, 213: 308-314, 1947.
38. YOUNG, R. M. & MOOD, G. McF. — Effect of penicillin on infection of guinea-pigs with *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bact.*, 50: 205-212, 1945.

Recebido para publicação em 31/5/1971.



## STUDIES OF THE HEPATITIS-ASSOCIATED-ANTIGEN (HAA) IN PATIENTS WITH VIRAL HEPATITIS AND IN "NORMAL" POPULATION GROUPS

J. A. N. CANDEIAS<sup>(1)</sup>

### SUMMARY

The sera of 55 patients with viral hepatitis were tested for HAA by gel-diffusion and complement-fixation tests. Only 27.2% were positive by both tests; 23.7% were positive by complement-fixation and negative by gel-diffusion. The remaining 49.1% were negative by both tests.

The HAA was not equally distributed in infectious hepatitis and serum hepatitis: only 24.0% of the cases of infectious hepatitis were positive by complement-fixation test whereas in the cases of serum hepatitis this percentage was 73.3%. A group of 765 "normal" persons, 309 from a sub-tropical area and 456 from a tropical area, were studied for the presence of HAA, and this antigen was detected in 0.3% of the persons living in the sub-tropical area and in 0.4% of the persons living in the tropical area.

### INTRODUCTION

Following the description by Blumberg and his associates<sup>2, 3</sup> of the Australia antigen and its selective association with viral hepatitis<sup>4-6</sup>, this subject has been intensively investigated. PRINCE<sup>20</sup> described, during the incubation period and early acute phase of serum hepatitis, an antigen, termed SH, which seems to be closely related and perhaps identical to the Australia antigen. DEL PRETE et al.<sup>9</sup> described a new hepatitis-associated antigen, EHAA, (epidemic-hepatitis-associated antigen) which appears to be specifically related to epidemic hepatitis, and they suggested that it seems likely that a multiplicity of antigens associated with hepatitis may become apparent. BLUMBERG et al.<sup>5</sup> and HIRSCHMAN et al.<sup>14</sup> reported that Australia antigen is present in the blood of a high proportion of patients with post-transfusion hepatitis, but less frequently in patients with infectious hepatitis. SHULMAN & BARKER<sup>23</sup> noted that Australia antigen has been detected more frequently in sera of

cases classified as serum hepatitis. There is growing evidence that the Australia antigen, also termed HAA, may be the virus or a virus-associated protein of serum hepatitis<sup>1, 12</sup>.

The present report is concerned with the investigation of the prevalence of HAA in a group of patients with both clinical types of hepatitis. We also investigated the distribution of the antigen in a group of "normal" persons. We used both the gel-diffusion and complement-fixation methods in these studies.

### MATERIALS AND METHODS

Two blood samples were obtained from 55 patients with one of the two types of viral hepatitis at the Hospital Emílio Ribas, in the city of São Paulo, Brazil. The distinction between infectious hepatitis and serum hepatitis was based on the clinical history, according to the classical features used for this subdivision. We studied 25 cases of in-

(1) Departament of Microbiology and Immunology of the Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

fectious hepatitis and 30 cases of serum hepatitis.

Blood samples were also drawn from 765 "normal" persons from the city of São Paulo and from Vila Amazonas in the Federal Territory of Amapá, Brazil. The city of São Paulo is a populous center (6.000.000 inhabitants) with a sub-tropical to temperate climate; Vila Amazonas is located in a scarcely inhabited and tropical territory on the Equator.

The antiserum E.G.S. used for the gel-diffusion and complement-fixation tests was obtained from a patient who had received multiple blood transfusions. The specificity of this serum was compared with that of a reference serum kindly supplied by Dr. Y. E. Cossart. All sera were inactivated at 56°C for one hour before use in the complement-fixation tests, which were performed using a 4 volumes of 0.02 ml technique, overnight fixation at 4°C, 2 1/2 units of complement and 50.0% endpoint readings. Screening of the sera for HAA was done by serial twofold dilutions and tested against one dilution of the indicator serum E.G.S., containing 4 units of antibody.

The gel-diffusion tests were performed using 1.0% agarose in a buffer consisting of 0.1 M NaCl, 0.01 M Tris, 0.001 M E.D.T.A. and 1.0 mg/ml protamine sulphate with 0.08% sodium azide as preservative. We used 1.5 ml volumes on microscope slides and a pattern of 6x2 mm diameter wells surrounding a central well with 6 mm distances between centers. The slides were read after a 7 day period of incubation at room temperature in a moist chamber. The indicator serum, E.G.S., was used untreated and undiluted.

#### RESULTS

Details of the 55 sera examined for the presence of hepatitis-associated-antigen(HAA) are shown in Tables I, II and III.

Of the 28 patients positive for HAA by the complement-fixation test, 24.0% had infectious hepatitis and 73.3% serum hepatitis (Table I). Considering all the cases, independently of their clinical categories, the occurrence of HAA in the first specimen of serum obtained from the 55 patients is shown in Table II. Of the sera, 49.1% were completely negative, 27.2% were positive by both gel-diffusion and complement-fixation tests and 23.7% positive by complement-fixation test only.

TABLE I

Number and percentage of cases of infectious and serum hepatitis where HAA was detected in the first specimen of serum

Clinical diagnosis	HAA (+)		HAA (-)		Total
	No.	%	No.	%	
I. hepatitis	6	24.0	19	76.0	25
S. hepatitis	22	73.3	8	26.7	30
Total	28	50.9	27	49.1	55

TABLE II

Percentage of cases where HAA was detected in the first specimen of serum

Complement-fixation			Total
	HAA (+)	HAA (-)	
Gel-diffusion			
HAA (+)	27.2%	0%	27.2%
HAA (-)	23.7%	49.1%	72.8%
Total	50.9%	49.1%	100.0%

In Table III are shown the results of complement-fixation and gel-diffusion tests for HAA in paired sera and the serum-levels of glutamicoxaloacetic transaminase (S.G.O.T.), in the 2<sup>nd</sup> one.

Although the complement-fixation test, recently described for detection of HAA, is somewhat more sensitive than the agar gel-diffusion test, it presents some features, which have to be considered in order to evaluate the results adequately. In Table IV we present the features of the complement-fixation test observed during the detection of HAA.

As shown in Figure 1, the HAA was present most commonly during the first weeks of the disease in cases of infectious hepatitis.

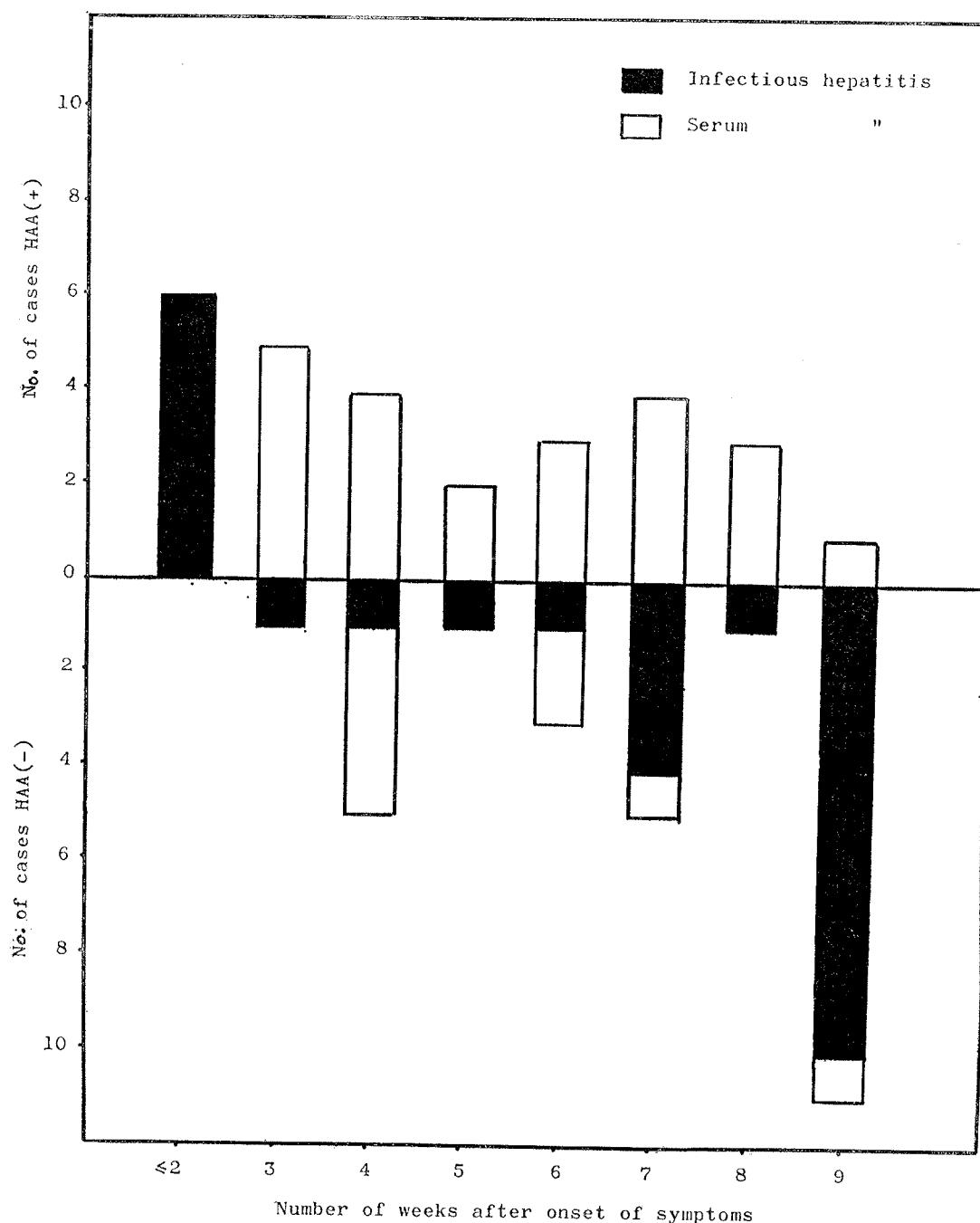


Fig. 1 — Distribution of the cases of hepatitis according to the HAA, the clinical diagnosis and the number of weeks after onset of the symptoms

In cases of serum hepatitis the HAA persisted for at least 9 weeks. In all 6 cases of infectious hepatitis positive for HAA, the specimen of serum tested was collected during the first two weeks after the onset of symptoms.

Among the 765 "normal" persons investigated (Table V), living in two different climatic areas, sub-tropical and tropical, the antigen was present in one of the 309 persons in São Paulo (0.3%) and in two of the 456 in Amapá (0.4%).

T A B L E III  
Detection of HAA in paired sera and values of S.G.O.T.

Case No.	First serum			Second serum			
	Days after onset	C.F.T.	Gel	Days after onset	C.F.T.	Gel	S.G.O.T.
002	25	> 64	+	40	32	-	72 U.
007	45	32 (*)	+	60	0	-	93 U.
008	14	16	-	29	0	-	86 U.
009	30	16	-	45	2	-	99 U.
012	26	32	+	41	64	-	74 U.
017	47	> 64	+	62	32	+	49 U.
018	24	64	-	39	16	-	69 U.
020	8	> 64 (*)	-	23	2	-	400 U.
024	36	64	+	51	16	+	80 U.
031	10	> 64	-	25	2	-	40 U.
032	42	64	+	57	0	-	43 U.
035	38	32	+	53	8	-	76 U.
036	21	16 (*)	-	36	0	-	382 U.
042	37	64	+	52	2	-	67 U.
050	45	32	-	60	0	-	52 U.
051	13	32	+	28	2	-	68 U.
052	43	16	-	58	0	-	85 U.
053	60	64	+	75	16	+	96 U.
054	60	32	-	75	0	-	73 U.
058	58	32 (*)	+	73	0	-	92 U.

(\*) Anticomplementary in dilutions 1:2 and 1:4

T A B L E IV  
Features of the complement-fixation test

Features C.F.T.	C.F.T. titres						Total
	2	4	8	16	32	64	
Prozone	0	0	3 (*)	0	0	3	3
Anticompl.	3 (*)	1 (*)	0	1	2	1	4
Clumps	0	0	1	4	2	4	11
Total positive C.F.T.	0	0	1	6	10	11	28

(\*) Titres at which prozone was demonstrated or anticomplementarity was observed

TABLE V  
Distribution of HAA in two groups of "normal"  
persons of São Paulo and Amapá

Age (years)	No. studied		HAA (+)			
			São Paulo		Amapá	
	São Paulo	Amapá	No.	%	No.	%
5-10	0	82	0	0	0	0
10-15	0	98	0	0	0	0
15-20	54	56	0	0	0	0
20-25	39	87	0	0	0	0
25-30	102	49	1	0.9	0	0
30-35	69	32	0	0	1	3.1
> 35	45	52	0	0	1	1.9
Total	309	456	1	0.3	2	0.4

#### DISCUSSION

According to PRINCE<sup>20</sup> the HAA is related mainly to serum hepatitis, but others<sup>17, 27</sup> accept the association of this antigen with both clinical types. KRUGMAN et al.<sup>15, 16</sup>, CHANG & O'BRIEN<sup>7</sup> and SOULIER et al.<sup>24</sup> were unable to detect the HAA in cases of epidemic hepatitis. Our results show a significant difference between the percentage of cases of infectious hepatitis in which it was possible to detect the HAA (24.0%) and the percentage of cases of serum hepatitis positive for the same antigen 73.3%. If we consider that our cases of infectious hepatitis were all adults who normally have different epidemiological and immunological characteristics than those observed in childhood hepatitis<sup>26</sup>, and if we think of the possibility of nonparenteral transmission of serum hepatitis<sup>13, 25</sup>, it seems that the occurrence of the HAA in cases of infectious hepatitis could very well be explained by contact infections with the serum hepatitis agent. We can not discard the fact that in some cases different criteria for making the clinical distinction between infectious hepatitis and serum hepatitis were employed.

Published material<sup>10, 11, 17</sup> suggests that the HAA antigen would have been detected in a greater percentages of cases if sera had been tested earlier in the course of illness. While for cases of infectious hepatitis our

finding that the antigen was not detectable after the first 2 weeks appears to corroborate this, we were able to identify the HAA up to 9 weeks after the onset of symptoms in patients with serum hepatitis (Figure 1).

Our failure to establish a relationship between the presence of HAA and abnormal values of S.G.O.T. is not consistent with the concept that the antigen disappears as serum transaminase returns to normal<sup>4, 19, 27</sup>. COSSART & VAHRMAN<sup>8</sup> found as we did that there was no correlation between return of serum transaminase to normal and loss of antigen from the serum.

Although more time-consuming to perform the complement-fixation technique provide a valuable diagnostic test for hepatitis. When detecting HAA the occurrence of positive sera with anticomplementary activity is a common observation<sup>18, 23</sup>. We observed an anticomplementary activity in 4 of the 28 positive sera, at the dilutions of 1:2 and 1:4, as well as a "prozone" phenomenon in 3 sera. This anticomplementary activity, according to PURCELL et al.<sup>21</sup> represents immune complexes serologically distinct from HAA. Although SHULMAN & BARKER<sup>23</sup> propose that such anticomplementarity can occur without the presence of antigen in the blood, none of the 765 specimens of sera obtained from "normal" persons, nor from the patients with negative sera presented anticomplementary activity.

As has been frequently observed the sensitivity of the complement-fixation test allows the detection of HAA in a greater percentage of sera than the gel-diffusion test. While 27.2% of the sera from the 55 cases of hepatitis gave positive results for HAA by both complement-fixation and gel-diffusion tests, we could not find any sera which react only by gel-diffusion (Table II).

HAA has been found in blood samples from various normal population groups<sup>2, 22</sup> and some authors suggest the possibility of explaining the persistence of the antigen by inherited and acquired factors<sup>2, 4</sup>. The data presented in relation to the "normal" groups we studied (Table V) are supported by SALZANO & BLUMBERG<sup>22</sup> who found a percentage of 0.5% in groups of healthy individuals from southern Brazilian populations. It seems interesting to consider that our findings of 0.3% in individuals from São Paulo, an area of sub-tropical to temperate climate, and 0.4% in individuals from Vila Amazonas, an area of tropical climate, show no significant difference. The frequency obtained in the group from the tropical area studied

is somewhat less than that found in several other tropical populations<sup>4, 22</sup>. It was not possible for us to establish a clear pattern of age dependence characterizing HAA in our "normal" populations. Our data revealed a higher frequency in the older age groups and not in the younger as others have invariably found<sup>22</sup>. Since the numbers tested are small, however, and irregularly distributed by age our observation may not be significant.

#### RESUMO

#### *Estudos sobre o antígeno associado à hepatite (AAH) em pacientes com hepatite viral e em grupos de indivíduos "normais"*

Foram examinados, para a pesquisa de AAH, através de reações de fixação do complemento e difusão em gel de ágar, sêros obtidos de 55 casos de hepatite viral. A porcentagem de casos positivos pelas duas reações foi de 27,2%, 23,7%, mostrou-se positiva na reação de fixação de complemento e negativa na difusão em gel de ágar; a porcentagem de casos negativos, nas duas reações, foi de 49,1%. A distribuição porcentual do AAH nos casos de hepatite infecciosa e hepatite por sôro foi, respectivamente, 24,0% e 73,3%, valores estes obtidos através da reação de fixação do complemento. Foi igualmente estudado um grupo de 765 indivíduos "normais", dos quais 309 residindo numa região sub-tropical e 456 numa região tropical: as porcentagens de positividade para o HAA, usando a reação de fixação do complemento, foram respectivamente 0,3% e 0,4%.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Our thanks are due to Dr. Y. Cossart for providing us with reference reagents and for her valuable suggestions; to Dr. José Aly for his cooperation in obtaining the serum samples and the clinical data; and to Dr. Gastão Rosenfeld and Dr. F. Antonacio, who provided the sera obtained from multiple-transfused patients.

#### REFERENCES

- BAYER, M. E.; BLUMBERG, B. S. & WERNER, B. — Particles associated with Australia antigen in the sera of patients with leukaemia. Down's syndrome and hepatitis. *Nature (Lond.)*, **218**:1057-1059, 1969.
- BLUMBERG, B. S. — Family studies of a human serum iso-antigen system (Australia antigen). *Amer. J. hum. Genet.*, **18**:594-608, 1966.
- BLUMBERG, B. S.; ALTER, H. J. & VISNICH, S. — A "new" antigen in leukemia sera. *J. Amer. med. Ass.*, **191**:541-546, 1965.
- BLUMBERG, B. S.; SUTNICK, A. I. & LONDON, W. T. — Hepatitis and leukemia: their relation to Australia antigen. *Bull. N. Y. Acad. Med.*, **44**:1566-1586, 1968.
- BLUMBERG, B. S.; SUTNICK, A. I. & LONDON, W. T. — Australia antigen and hepatitis. *J. Amer. med. Ass.*, **207**:1895-1896, 1969.
- BLUMBERG, B. S.; SUTNICK, A. I. & LONDON, W. T. — Australia antigen as an hepatitis virus. *Amer. J. Med.*, **48**:1-8, 1970.
- CHANG, L. W. & O'BRIEN, T. F. — Australia antigen serology in the Holy Cross Football Team hepatitis outbreak. *Lancet*, **2**:59-62, 1970.
- COSSART, Y. & VAHRMAN, J. — Studies of Australia-SH antigen in sporadic viral hepatitis in London. *Brit. med. J.*, **1**:403-405, 1970.
- DEL PRETE, S.; CONSTANTINO, D.; DOGLIA, M.; GRAZIINA, A.; AJDUKIEWICZ, A.; DUDLEY, F. J.; FOX, R. A. & SHERLOCK, S. — Detection of a new serum-antigen in three epidemics of short-incubation hepatitis. *Lancet*, **2**:579-581, 1970.
- GILES, J. P.; MCCOLLUM, R. W.; BERNDTSON Jr., L. W. & KRUGMAN, S. — Viral hepatitis. *New Engl. J. Med.*, **281**:119-122, 1969.
- GOCKE, D. J. & KAVEY, N. B. — Hepatitis antigen. *Lancet*, **1**:1055-1059, 1969.
- GOCKE, D. J.; GREENBERG, H. B. & KAVEY, N. B. — Correlation of Australia antigen with posttransfusion hepatitis. *J. Amer. med. Ass.*, **212**:877-879, 1970.
- HADZIYANNIS, S. J. & MERIKAS, G. E. — Australia antigen in a family. *Lancet*, **1**:1057-1058, 1970.
- HIRSCHMAN, R. J.; SHULMAN, N. R.; BARKER, L. F. & SMITH, K. O. — Virus like particles in sera of patients with infectious and serum hepatitis. *J. Amer. med. Ass.*, **208**:1667-1670, 1969.
- KRUGMAN, S.; GILES, J. P. & HAMMOND, J. — Infectious hepatitis: evidence for two distinctive clinical, epidemiological and immunological types of infection. *J. Amer. med. Ass.*, **200**:365-373, 1967.
- KRUGMAN, S. & GILES, J. P. — Viral hepatitis — new light on an old disease. *J. Amer. med. Ass.*, **212**:1019-1029, 1970.
- LONDON, W. T.; SUTNICK, A. I. & BLUMBERG, B. S. — Australia antigen and acute viral hepatitis. *Ann. intern. Med.*, **70**:55-59, 1969.
- MILLMAN, I.; LONDON, W. T.; SUTNICK, A. I. & BLUMBERG, B. S. — Australia antigen-antibody complexes. *Nature (Lond.)*, **226**:83-84, 1970

19. NAGINGTON, J. — Chronic carriage of Australia antigen without symptoms after renal transplant. *Brit. med. J.*, **4**:409-410, 1970.
20. PRINCE, A. M. — An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **60**:814-821, 1968.
21. PURCELL, R. H.; HOLLAND, P. V.; WALSH, J. H.; WONG, D. C.; MORROW, A. G. & CHANOCK, R. M. — A complement-fixation test for measuring Australia antigen and antibody. *J. infect. Dis.*, **120**:383-386, 1969.
22. SALZANO, F. M. & BLUMBERG, B. S. — The Australia antigen in Brazilian healthy persons and in leprosy and leukaemia patients. *J. clin. Path.*, **23**:39-42, 1970.
23. SHULMAN, N. R. & BARKER, L. F. — Virus — like antigen, antibody and antigen — antibody complexes in hepatitis measured by complement-fixation. *Science*, **165**: 304-306, 1969.
24. SOULIER, J. P.; COUROUÇÈ-PAUTY, A. M. & BENAMON-DJIANE, D. — Étude immunologique des hépatites à virus. Recherches de l'antigène Australie et de l'anticorps correspondant. *Rev. franc. Transfus.*, **12**: 361-382, 1969.
25. SZMUNESS, W.; PICK, R. & PRINCE, A. M. — The serum hepatitis specific antigen(SH): a preliminary report of epidemiologic studies in an institution for the mentally retarded. *Amer. J. Epidem.*, **92**:51-61, 1970.
26. SZMUNESS, W. & PRINCE, A. M. — Epidemiologic patterns of viral hepatitis in Eastern Europe in the light of recent findings concerning the serum hepatitis antigen. *J. infect. Dis.*, **123**:200-212, 1971.
27. WRIGHT, R.; McCOLLUM, R. W. & KLATSKIN, G. — Australia antigen in acute and chronic liver disease. *Lancet*, **1**:117-124, 1969.

Recebido para publicação em 7/7/1971.



## ESTUDIO INMUNO-ELECTROFOCAL DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Miguel A. GUZMÁN, M.D.-M Sc.<sup>(1)</sup> & Ernesto BARBOSA, M.D.-Ph.D.<sup>(2)</sup>

### RESUMEN

Se presenta el estudio eletrofocal del suero humano combinado con inmunodifusión e inmunoelectroforesis, analizando las posibilidades de este sistema en los estudios inmunoquímicos.

### INTRODUCCIÓN

El siguiente trabajo tiene por objeto presentar las ventajas del estudio inmunoelectrofocal de las proteínas plasmáticas, particularmente en lo referente a aquellas protínicas de mayor interés en el campo de la inmunología tales como el complejo grupo de las inmunoglobulinas<sup>1, 7, 9, 10, 13, 17, 18, 21</sup>, y la complementación de este método con los procedimientos inmunoelectroforéticos.

### MATERIAL Y MÉTODOS

*Suero Anti-humano:* El suero anti-humano utilizado en todas las reacciones fue preparado en conejo.

*Suero Humano:* Este suero fue obtenido de sujetos supuestamente sanos.

*Inmunodifusión:* Para las pruebas de inmunodifusión en el estudio de algunas fracciones se utilizó agar noble (Difco) obtenido comercialmente.

*Electro-Enfoque:* Los estudios de electroenfoque se realizaron en una columna LKB, utilizando un portador de anfolitos de espectro pH 3-10.

*Inmunoelectroforesis:* Los estudios de inmunoelectroforéticos se realizaron en un sistema Beckman.

*Buffer:* El buffer utilizado en todas las reacciones de inmunodifusión así como en las pruebas inmunoelectroforéticas fue un buffer de veronal pH 8-6.

Las determinaciones de pH se realizaron en un potenciómetro Beckman de investigación utilizando un microelectrodo y cámara termomática a 37,5°C. Las determinaciones de absorción se realizaron en un espectrofotómetro Beckman D. U.

El suero antihumano utilizado en este trabajo se preparó en conejos por inoculación intramuscular repetida de una mezcla de sueros humanos de personas supuestamente sanas, el procedimiento seguido fue el recomendado por PROOM<sup>15</sup>. Cuando se consideró por las técnicas convencionales que los títulos de anticuerpos podrían ser adecuados, los conejos fueron sangrados a muerte, la sangre recolectada asépticamente, el suero separado, adicionado de merthiolate al 1:10.000, estudiado por inmunodifusión tipo OUCHTERLONY<sup>14</sup> y guardado a -20°C, para ser usado en todas las pruebas de identificación de las fracciones obtenidas.

La columna para electroenfoque fue montada según las normas descritas por HAGLUND<sup>5</sup>, utilizando un portador de anfolitos pH 3-10 y 3,0 ml de suero humano normal obtenido minutos antes de iniciar el fraccionamiento. Una vez colocada la muestra en el gradiente de pH, se sometió a una corrien-

(1) Laboratorio de Microbiología e Inmunología — INPES — Bogotá, Colombia

Profesor Asociado — Facultad de Medicina — Universidad Nacional

(2) Laboratorio de Bioquímica — INPES — Bogotá, Colombia

Profesor Asociado — Facultad de Medicina — Universidad Nacional

te continua de 450 voltios y 6 mA por 72 horas, tiempo medio considerado suficiente para obtener un buen electroenfoque. Posteriormente las fracciones fueron colectadas automáticamente en cantidades exactas de 1,0 ml, cantidad considerada como óptima en virtud de la longitud de la columna y el espectro del gradiente de pH. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas para remover el precipitado de lipoproteínas que siempre se forma, dado que estas son incompatibles con el sistema de electroenfoque<sup>5</sup>. A cada una de estas muestras se le determinó cuidadosamente su pH, para conocer su punto isoeléctrico, y así poder posteriormente correlacionarlo con la actividad biológica de la proteína allí contenida. Igualmente se leyó cada muestra espectrofotométricamente a 2.800 Å con el objeto de conocer la concentración de proteína y relacionarla posteriormente con el gradiente.

Con el objeto de saber si las fracciones colectadas tenían alguna actividad biológica se realizaron estudios de inmunodifusión tipo OUCHTERLONY<sup>14</sup> en lámina de vidrio de 3,0 x 9,0 cmts., siguiendo una técnica de preparación similar a la recomendada por HIRSCHFELD<sup>6</sup> y GRABAR & WILLIAMS<sup>4</sup>, para inmunoelectroforesis. Cada fracción fue depositada en un orificio frente al cual se depositó el suero anti-humano, en cantidad adecuada; las placas fueron puestas en cámara húmeda y dejadas a temperatura ambiente por 24 horas, al término de las cuales, fueron examinadas para anotar la reacción y, posteriormente, se procesaron para conservación permanente, según técnica de HIRSCHFELD<sup>6</sup>. Con el objeto de determinar si realmente cada una de las muestras correspondía a una fracción diferente, se hicieron mezcla de las fracciones que en el estudio anterior parecían ser idénticas y se estudiaron en similar forma frente al antisuero humano. Para tratar de identificar las fracciones obtenidas y poder correlacionar su punto isoeléctrico con la actividad biológica, se realizaron estudios de inmunoelectroforesis de cada una de las fracciones frente al antisuero humano y comparativamente con un suero humano control. Con el objeto de conocer el grado de recuperación de las distintas fracciones séricas, se mezclaron partes alícuotas de cada fracción y una muestra de esta mezcla total se estudió inmunoelectroforéticamente frente al suero anti-humano y a un suero humano control.

## RESULTADOS

La Tabla I muestra que, efectivamente colectadas las fracciones y leído su pH, se observa una progresión de tales valores, lo cual indica que un gradiente de pH fue obtenido; dichos valores se iniciaron y terminaron con valores menores de pH 1 correspondientes al ácido sulfúrico del ánodo y parte de este que se desliza del cátodo finalmente al colectar la última fracción. El estudio de inmunodifusión, frente al antisuero humano, demostró que por lo menos 60 de las fracciones colectadas, eran biológicamente activas, tal como puede apreciarse en la misma tabla. La Figura 1 muestra cómo por inmunodifusión fácilmente se demuestra la presencia de proteína en la fracción, cómo algunas de ellas están absolutamente puras y otras dejan ver nítidamente varias bandas de precipitación, indicando con ello que en la fracción están contenidas más de una proteína con capacidad antigenica distinta pero evidentemente con un punto isoeléctrico muy próximo. La Figura 2 muestra que el estudio de inmunodifusión de las mezclas de fracciones que se creían idénticas, son realmente diferentes, indicando el valor del punto isoeléctrico en la separación de éstas, así sea aquél muy cercano, lo cual está de acuerdo con lo descrito por HAGLUND<sup>5</sup>. La Figura 3 muestra, claramente, como el estudio inmunoelectroforético sirve para identificar por comparación con un suero humano normal las fracciones obtenidas en el gradiente de pH y cómo es conveniente complementar estos dos procedimientos. El estudio de recuperación de las proteínas séricas, muestra que excepción hecha de las lipoproteínas, la recuperación es total como lo muestra la Figura 4, en la cual se incluye además como referencia la inmunoelectroforesis de una fracción pura. La Figura 5 muestra la relación entre el espectro de absorción de las proteínas en cada fracción y el gradiente de pH. La Figura 6 muestra la relación entre la D.O. de las fracciones obtenidas y el estudio inmunoelectroforético de las mismas, observándose que existe una clara correlación entre la absorbancia y el número de bandas de precipitación en una muestra dada.

## DISCUSION

El análisis de las proteínas plasmáticas constituye uno de los estudios más interesantes en biología. En el campo cada vez más creciente y complejo de la Inmunología, este análisis se hace más importante y necesario dada la variedad de las inmunoglobulinas

TABLA I

Gradiente de pH de las fracciones obtenidas y su actividad biológica frente a un suero anti-humano

Fracción Nº	pH	Reacción	Fracción Nº	pH	Reacción	Fracción Nº	pH	Reacción
1	0,85	-	36	4,14	+	71	6,28	+
2	0,74	-	37	4,24	+	72	6,35	+
3	0,61	-	38	4,29	+	73	6,35	+
4	0,57	-	39	4,44	+	74	6,36	+
5	0,47	-	40	4,53	+	75	6,38	+
6	0,42	-	41	4,58	+	76	6,42	+
7	0,42	-	42	4,63	+	77	6,51	+
8	0,44	-	43	4,69	+	78	6,61	+
9	0,45	-	44	4,75	+	79	6,70	+
10	0,45	-	45	4,82	+	80	6,81	+
11	0,45	-	46	4,91	+	81	7,01	+
12	0,53	-	47	4,94	+	82	7,11	+
13	0,64	-	48	4,97	+	83	7,30	+
14	0,80	-	49	4,99	+	84	7,43	+
15	1,03	-	50	5,01	+	85	7,45	+
16	1,33	-	51	5,08	+	86	7,59	+
17	1,97	-	52	5,15	+	87	7,73	+
18	2,47	-	53	5,25	+	88	7,73	+
19	2,78	-	54	5,34	+	89	7,99	+
20	3,13	-	55	5,41	+	90	8,16	+
21	3,18	-	56	5,51	+	91	8,36	+
22	3,37	+	57	5,60	+	92	8,84	+
23	3,55	+	58	5,61	+	93	9,01	+
24	3,58	+	59	5,38	+	94	9,23	+
25	3,69	+	60	5,33	+	95	9,44	-
26	3,73	+	61	5,35	+	96	9,59	-
27	3,80	+	62	5,31	+	97	9,60	-
28	3,84	+	63	5,59	+	98	9,62	-
29	3,87	+	64	5,68	+	99	10,57	-
30	3,90	+	65	5,74	+	100	10,22	-
31	3,93	+	66	5,84	+	101	10,12	-
32	3,97	+	67	5,91	+	102	10,12	-
33	4,02	+	68	6,01	+	103	10,04	-
34	4,06	+	69	6,08	+	104	0,52	-
35	4,10	+	70	6,15	+	105	0,62	-

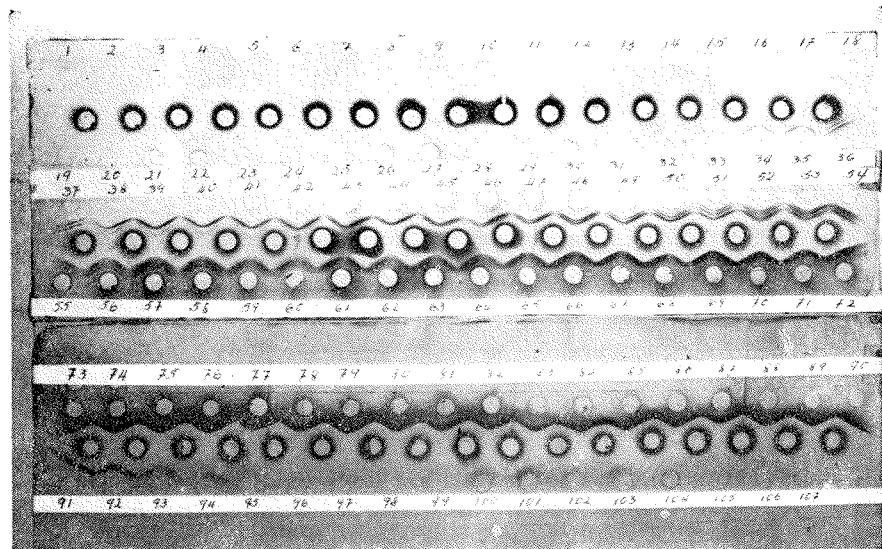


Fig. 1 — Doble inmunodifusión de cada una de las fracciones obtenidas de la columna electrofocal, frente a un suero hiperinmune antihumano obtenido en conejo

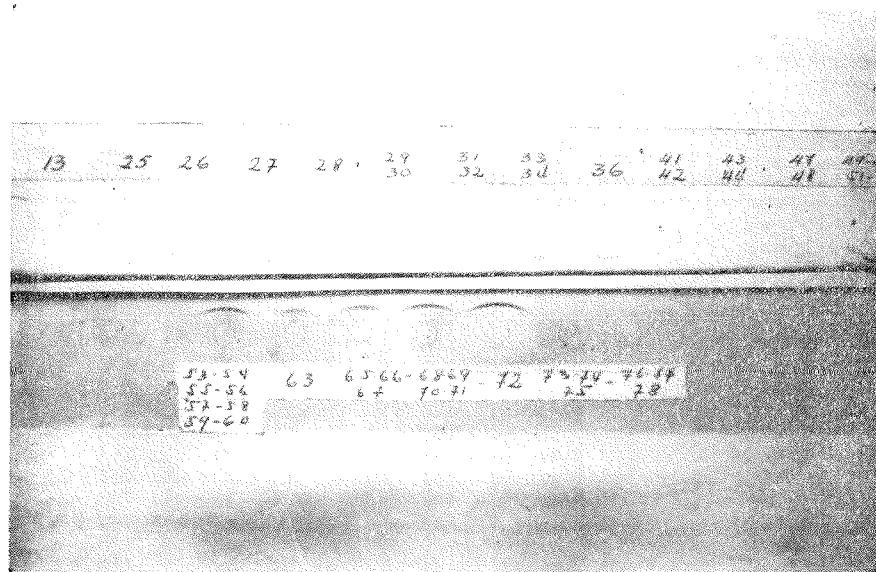


Fig. 2 — Doble inmunodifusión de mezclas de fracciones frente a un suero hiperrinmune antihumano obtenido en conejo. Obsérvese la presencia de bandas múltiples

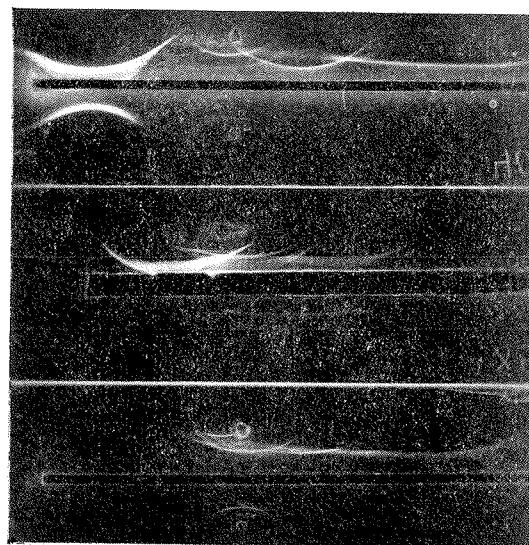


Fig. 3 — Inmunoelectroforesis para identificación de fracciones obtenidas por inmunolectroenfoque, por comparación con Inmunolectroforesis de un suero humano control. De arriba a abajo: Fracción N° 40, Albúmina; Fracción N° 85 IgG; Fracción N° 33, Transferrina

que han sido descritas en los últimos años<sup>1, 7, 9, 13, 17, 18, 24</sup>, las cuales tienen importancia no sólo como simples hechos biológicos, sino porque muchas de ellas están ligadas con fenómenos inmunopatológicos de la mayor importancia<sup>2, 3, 8, 12</sup>. Ninguno de los procedimientos conocidos tales como la electroforesis

de TISELIUS<sup>25, 26</sup>, la electroforesis en papel de filtro, en acetato de celulosa o la inmunolectroforesis<sup>4</sup>, permiten el estudio de una sola fracción ya que ninguno de estos procedimientos basados todos en la distribución sobre un sistema buffer de las cargas eléctricas relativas de las proteínas en un campo

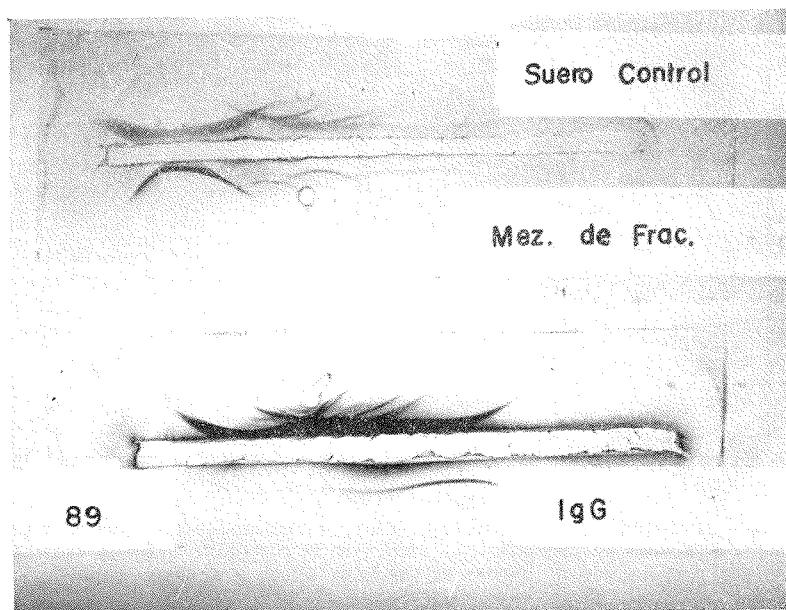


Fig. 4 — Inmunoelectroforesis de una mezcla de 72 fracciones (22 a 94) obtenidas de la columna electrofocal. Nótase la recuperación total por comparación con el suero control. En esta figura se incluye para mejor ilustración una Inmunoelectroforesis de una fracción pura (Fracción 89)

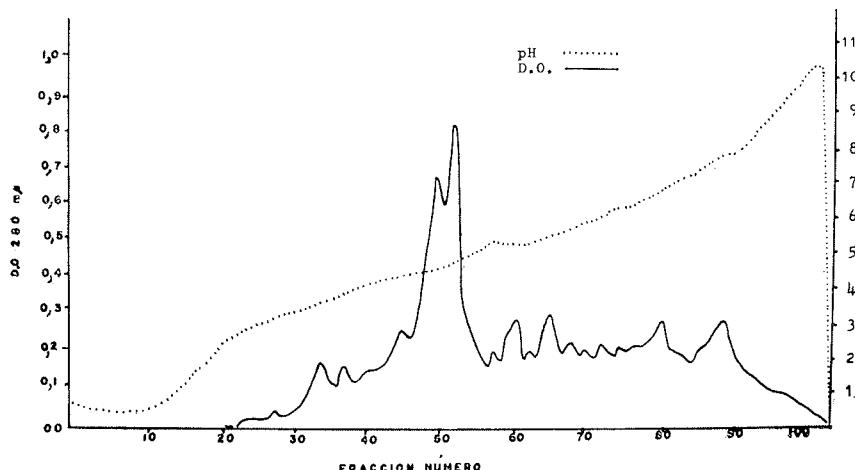


Fig. 5 — Relación entre el espectro de absorción de las proteínas y el gradiente pH

permiten una separación lo suficientemente discriminatoria para obtener una fracción deseada, pues siempre hay zonas de entrecruzamiento donde su identificación es muy difícil, así por ejemplo, la clásica electroforesis en papel en todas su modalidades solo nos permiten el estudio de 5 o máximo 6 fracciones usando bufferes de alta resolución (como los de Tris) bajo las cuales quedan cobijadas gran cantidad de proteínas plasmáticas con las denominaciones de globulinas Alfa, Beta o Gamma y la recuperación de estas fracciones es imposible para análisis

posteriores. La inmunoelectroforesis, que es un procedimiento mucho más discriminatorio, permite el estudio de por lo menos 30 fracciones biológica e inmunológicamente distintas pero tampoco nos permite recuperar las fracciones identificadas, ya que lo que allí queda es un precipitado antígeno-anticuerpo; cosa similar puede decirse de otros procedimientos de alta resolución, tales como la electroforesis en almidón<sup>19</sup> o en gel de acrilamida<sup>16</sup> en los cuales las fracciones separadas, aunque pueden recuperarse, el procedimiento para ello es dispendioso.

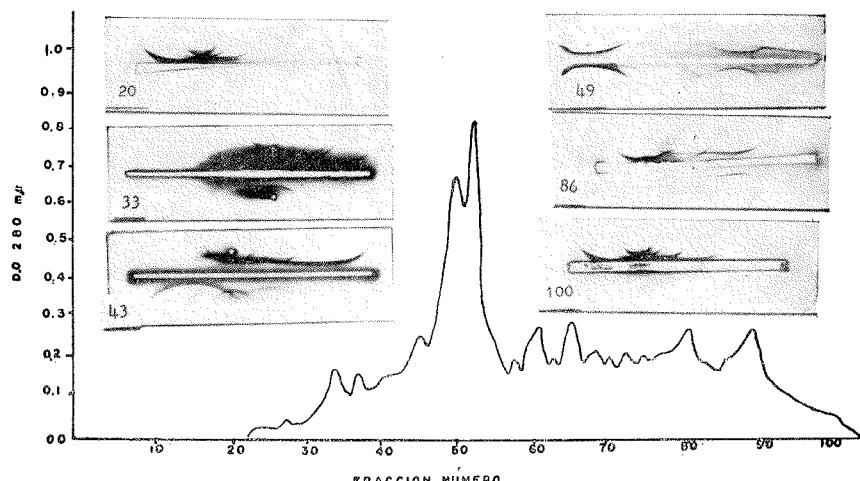


Fig. 6 — Relación entre la densidad óptica de algunas de las fracciones y el número de bandas de precipitación. Obsérvese la correlación entre la absorban- cia y el número de bandas de precipitación en una fracción dada

El uso de un gradiente de pH introducido por SVENSSON<sup>21</sup>, perfeccionado por el mismo autor más tarde<sup>22, 23</sup> y combinado con electroforesis<sup>27</sup>, permite que cada proteína plasmática encuentre su exacto punto isoeléctrico quedando allí focalizada, pudiéndose de tal manera colectar en forma individual y facilitándose grandemente los estudios posteriores que deseen hacerse con ella. La introducción dentro de los procedimientos de análisis de los portadores de anfolitos permite en forma fácil obtener el gradiente natural de pH en zonas muy variadas y por tanto hace posible la separación de proteínas cuyo punto isoeléctrico difiera tan poco como 0,01 unidad de pH<sup>5</sup>; por lo demás la muestra es recuperable y la cantidad es grande sin que la actividad biológica sufra alteración alguna, lo cual es admirable tratándose de sustancias tales como las inmunoglobulinas cuya actividad antigenica es crítica para los análisis immunoquímicos; contándose además con la posibilidad de preparar antisueros absolutamente monoespecíficos en huéspedes inmunológicos adecuados<sup>20</sup> con las fracciones antigenicas puras obtenidas con el portador de anfolitos de pH respectivo, sin recurrir a procedimientos más dispendiosos como los utilizados hoy día (GUZMÁN, M. & BARBOSA, E. — Preparación de sueros monoespecíficos con antígenos obtenidos por electroenfoque, 1971. En prensa). El uso del sistema de electroenfoque, aprovechando una propiedad fisicoquímica elemental, como es el punto isoeléctrico de las sustancias anfotéricas mediante el uso de portadores de anfolitos o gradientes térmicos de pH<sup>11</sup>, permite la recuperación de las fracciones proteicas sin

perder sus propiedades biológicas, abre un campo insospechado en la inmunoquímica moderna despijazando en parte otros procedimientos y permite una utilización mayor y complementaria de la inmunoelectroforesis en el análisis de las proteínas séricas.

#### CONCLUSIONES

1. La columna electrofocal permite una extraordinaria separación de las proteínas plasmáticas.
2. Las fracciones se pueden recuperar y conservar para análisis posteriores sin perder actividad biológica.
3. La fracción se aisla en base a un dato sumamente importante cual es el de su punto isoeléctrico.
4. La combinación de este estudio con inmunodifusión e inmunoelectroforesis constituye un buen sistema en los estudios immunoquímicos.
5. Los portadores de anfolitos no interfieren la reacción antígeno-anticuerpo.

#### SUMMARY

##### *Immuno-electrofocal study of plasmatics protein*

An electrofocal study on human sera utilizing immunodiffusion and electrophoresis is reported and the potencial of this system in immunochemical studies is analyzed.

## A G R A D E C I M I E N T O

Queremos expresar nuestro agradecimiento a las señoritas Elizabeth Castañeda y Rosa Stella Vargas por su cooperación en la parte técnica de este trabajo, igualmente al doctor Bernardo Buitrago por su permanente asistencia técnica en la elaboración del material fotográfico.

## B I B L I O G R A F I A

1. FRANKLIN, D. C. & STANWORTH, D. R. — Antigenic relationships between immunoglobulins and certain related para-proteins in man. *J. exp. Med.*, **114**:521-533, 1961.
2. GLYNN, L. E. & HOBOROW, E. J. — *Autoimmunity and Disease*. F. A. Davis Co. Philadelphia, Pa., 1965.
3. GOOD, R. A. & GABRIELSEN, A. E. — *The thymus in immunobiology structure, function and role in disease*. New York. Harper Row Publishers. 1964.
4. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A. — Méthods permettant l'étude conjugee des propriétés électrophorétiques et immunochimiques de un mélange de protéins. Application au sérum sanguin. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, **10**:193-194, 1953.
5. HAGLUND, H. — Isoelectric focusing in natural pH gradients. A. technique of Growing importance for fractionation and characterization of proteins. *Science Tools*, **14**(2):17-24, 1967.
6. HIRSCHFELD, J. — Immuno-electrophoresis — Procedure and application to the study of group specific variation in sera. *Science Tools*, **7**(2):18-25, 1960.
7. ISHIZAKA, K. & ISHIZAKA, T. — Physicochemical properties of reaginic antibody. I. Association of reaginic activity with immunoglobulin other than IgA or IgG. *J. Allergy*, **37**:169-185, 1966.
8. JANAWAY, C. A.; ROSEN, F. S.; MERLER, E. & ALPER, C. A. — *The Gamma Globulins*. The New England J. of Med. Medical Series. Boston, Little, Brown and Co., 1967.
9. JOHANSSON, S. G.; BENNICH, H. H. & WIDE, L. — A new class of immunoglobulin in human serum. *Immunology*, **14**:265-272, 1968.
10. KORNGOLD, L. & LIPARI, R. — Multiple-myeloma proteins. III. The antigenic relationship of Bence Jones proteins to normal gamma-globulin and multiple-myeloma serum proteins. *Cancer (Philad.)*, **9**:262-272, 1956.
11. LUNERS, S. J. & KOLLIN, A. — New approach to isoelectric focusing and fractionation of proteins in a pH gradient. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **66**(3):898-903, 1970.
12. MIESCHER, P. A. & MÜLLER-EBERHARD, H. — *Textbook of Immunopathology*. New York. Grune and Stratton, 1969.
13. Nomenclature, for Human immunoglobulins — Memorandum. *Bull. Wld Hlth Org.* **30**:447-450, 1964.
14. OUCHTERLONY, O. — Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progr. Allergy*, **5**:1-78, 1958.
15. PROOM, H. — The preparation of precipitating sera for the identification of animal species. *J. Path. Bact.*, **55**:419-426, 1943.
16. RAYMOND, S.; NAKAMICHI, M. & AURELL, B. — Acrylamide gel as an electrophoresis medium. *Nature (Lond.)*, **195**:697-698, 1962.
17. ROWE, D. S. & FAHEY, J. L. — New class of human immunoglobulins. I. Unique myeloma protein. *J. exp. Med.*, **121**:171-184, 1965.
18. ROWE, D. S. & FAHEY, J. L. — New class of human immunoglobulins. II. Normal Serum IgD. *J. exp. Med.*, **121**:185-199, 1965.
19. SMITHIES, O. — Zone electrophoresis in starch gels: Group variation in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**:629-641, 1955.
20. SOBER, H. A.; GUTTER, F. J.; WYEKOFF, M. M. & PETERSSON, E. A. — Fractionation of proteins. II. Fractionation of serum protein on anion exchange cellulose. *J. Amer. chem. Soc.*, **78**:756-763, 1956.
21. SVENSSON, H. — Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. I. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases. *Acta chem. scand.*, **15**:325-341, 1961.
22. SVENSSON, H. — Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. II. Buffering capacity and conductance of isoionic ampholytes. *Acta chem. scand.*, **16**:456-466, 1962.
23. SVENSSON, H. — Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. III. Description of apparatus for electrolysis in columns stabilized by density gradients and direct

- determination of isoelectric points. *Arch. Biochem.*, **1**:132-138, 1962.
24. TERRY, W. D. & FAHEY, J. L. — Subclasses of human Gamma, globulin bases on heavy polypeptide chains. *Science*, **146**: 400-401, 1964.
25. TISELIUS, A. — Electrophoresis of serum globulin. II. Electrophoretic analysis of normal and immune sera. *Biochem. J.*, **31**:1464-1477, 1937.
26. TISELIUS, A. & KABAT, E. A. — Electrophoresis of immune serum. *Science*, **87**: 416-417, 1938.
27. VESTERBERG, O. & SVENSSON, H. — Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobin. *Acta chem. scand.*, **20**:820-834, 1966.

Recebido para publicação em 22/3/1971.

## ANTI-RABIES REVACCINATION IN HUMANS

### II — Preventive immunization with few doses and the effect of one single booster dose

Octavio Augusto Carvalho PEREIRA<sup>(1)</sup>, Antonella GODANO<sup>(2)</sup>, Ester Luiza BOCATO<sup>(2)</sup>, Terezinha RAPHAELIAN<sup>(3)</sup> & Luiza T. M. SOUZA<sup>(2)</sup>

#### S U M M A R Y

The Authors studied the results of anti-rabies revaccination with one single dose of 2.0 ml, on patients which had been vaccinated 13 months before with 5 doses. The vaccine employed was the Fuenzalida & Palacios type, with effective immune responses in the 28 cases studied.

The evaluation of the rate of immunity was always done by the Complement Fixation reaction, the serum neutralization test being also performed whenever mice were available.

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

According to the WHO<sup>4</sup>, persons exposed to exceptional and repeated risks of infection (those working with rabies virus in laboratories, veterinarians, dogcatchers, naturalists, etc.) should be protected through preventive immunization, with 2 or 3 doses of anti-rabies vaccine of sufficient antigenic activity and, if possible, prepared without nervous tissue. The injections should be administered at intervals of 1 month, with one booster dose in the 6th month of vaccination. Persons thus vaccinated, who continue to be exposed to infection, should be revaccinated after 1-3 years with new booster doses.

According to SHIPLEY & JUBELT<sup>7</sup>, individuals who fail to develop rabies antibodies after initial prophylactic treatment should continue receiving booster doses until a positive response is obtained. The vaccination schedule adopted by these authors consisted in a primary series of 2 subcutaneous doses of 1.0 ml, with 1 month interval between the doses, and 1 booster dose of 1.0 ml, 6-8 months afterwards.

COHEN et al.<sup>2</sup> observed greater rapidity and intensity of responses through neutralizing antibodies in individuals vaccinated one year before and who had received one booster dose.

Based on the general immunologic principles, WHO<sup>4</sup> recommends, for subjects previously vaccinated, the administration of one booster dose of anti-rabic vaccine in cases of light exposition, and a series of 5 doses on consecutive days, followed by a booster dose on the 20th day, when exposition is heavy, provided the response to previous vaccination has been evinced by the presence of antibodies.

PEREIRA et al.<sup>6</sup>, however, have observed failures, although in a small percentage of cases, when only one booster dose was given. Furthermore they observed that higher titers were obtained through the employment of larger series, the maximal response being obtained with 4-5 doses.

PEREIRA<sup>5</sup> has still observed effective responses in 6 out of 7 cases in which the primary vaccination was done with a series of 5 doses.

(1) Departament of Microbiology and Parasitology of the Escola Paulista de Medicina, São Paulo, Brazil  
(2) Instituto Pasteur, São Paulo, Brazil  
(3) Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, São Paulo, Brazil

The present work was carried out with the purpose of studying the response to preventive vaccination with later booster revaccination. The evaluation of this response was made by Complement Fixation test (CF), the correlation of which, with the Serum-Neutralization test (SN), being demonstrated by PEREIRA et al.<sup>6</sup>. Whenever possible and depending on the availability of animals, this correlation was tested by SN.

We employed 5 doses instead of 2 or 3 as recommended by WHO<sup>4</sup>, in the initial schedule, because the verification of immunologic response is not done as a routine in our environment and SHIPLEY & JUBELT<sup>7</sup> observed that this schedule has presented failures in 22.2% of the cases.

On the other hand, we do not use revaccination after 6-8 months, because we have verified in a previous work that the time elapsed between the first vaccination and the booster does not decisively interfere in the result of the latter<sup>6</sup>.

## MATERIAL AND METHODS

### 1) Patients

The present study was carried out on 28 patients, of whom only one had had previous experience with anti-rabies vaccination. It is the case no. 13, who had two years before received 4 doses of the semple type vaccine.

### 2) Vaccination

The patients received 5 doses of vaccine of the Fuenzalida & Palacios type, on consecutive days; 13 months later they received one booster dose of 2.0 ml of the same vaccine.

### 3) Sera

A blood sample was always taken on the revaccination day and after this, other samples were collected as indicated on Table I.

TABLE I  
Immuno response after booster with a single dose of 2.0 ml of anti-rabic vaccine

Patients	1st Collecting			2nd Collecting			3rd Collecting		
	Day	Result		Day	Result		Day	Result	
		C.F.	S.N.		C.F.	S.N.		C.N.	S.N.
1	0	—	< 5	81	16	—	—	—	—
2	0	—	< 5	21	4	346	36	4	56
3	0	—	8	16	—	28	16	—	—
4	0	—	14	64	—	—	—	—	—
5	0	—	8	4	> 625	—	—	—	—
6	0	—	75	8	> 625	—	—	—	—
7	0	—	67	4	—	—	—	—	—
8	0	—	8	32	—	49	16	—	—
9	0	—	< 5	8	8	> 625	28	8	625
10	0	—	8	8	—	65	8	—	—
11	0	—	19	16	—	—	—	—	—
12	0	—	8	16	—	34	32	—	—
13	0	2	> 125	7	4	> 625	41	2	—
14	0	—	49	4	—	75	16	—	—
15	0	—	8	2	—	21	2	—	—
16	0	—	19	16	—	34	16	—	—
17	0	—	8	8	—	28	8	—	—
18	0	—	7	8	—	20	8	—	—
19	0	—	14	8	—	—	—	—	—
20	0	—	70	8	—	—	—	—	—
21	0	—	19	32	—	—	—	—	—
22	0	—	8	2	125	28	2	—	—
23	0	—	8	2	—	65	AC 2	—	—
24	0	—	< 5	17	8	—	—	—	—
25	0	—	9	32	—	27	8	—	—
26	0	—	26	32	—	67	8	—	—
27	0	—	13	64	—	34	64	—	—
28	0	—	8	4	—	49	4	—	—

The sera were separated in sterile conditions and kept in freezer at -25°C until used.

Three pools of sera were prepared: the first, from the samples taken before administration of the booster dose; the second, from sera collected between the 7th and the 9th day, and third 30-70 days after revaccination.

#### 4) Complement Fixation test

Performed according to PEREIRA et al.<sup>6</sup>.

#### 5) Serum Neutralization test

This was done following the technique described by ATANASIU<sup>1</sup>, with utilization of the CVS strain.

The sera corresponding to the first taking were diluted up to 1/125. For the others we used also the dilution 1/625.

### RESULTS

Of the 28 sera collected before the booster dose, 27 were negative by CF. The positive serum came from patient no. 13, the only one who had been previously vaccinated with this antigen.

In the later collectings we always found complement fixing antibodies, in titers varying from 2 to 64 (Table II).

TABLE II

Medium immunoreaction after booster with a single dose of 2.0 ml of anti-rabic vaccine

Results \ Serum pool	0 days	7-9 days	30-70 days
C F	—	8	4
S N	10	179	347

The SN was made with 4 sera taken before the booster dose. Of these, 3 presented a titer below 5. Only patient no. 13, still with detectable antibodies through CF, showed a neutralizing titer above 125.

Of the sera taken after revaccination and submitted to SN, one presented titer 56 and the others titers above 125.

The results of the titration of antibodies by CF and SN in the three serum pools appear on Table II.

The neutralizing titers were obtained against 562 LD<sub>50</sub>.

### DISCUSSION

The revaccination schedule with a single dose of 2.0 ml produced effective immune response in the total of cases studied. This fact suggests that all patients had responded to the antigenic stimulus of primary vaccination, although this fact was not verified.

However, we did not find complement fixing antibodies with the exception of case 13, the only one with a previous vaccination history. This finding is in agreement with those of PEREIRA et al.<sup>6</sup>, who observed a longer permanence of immunity in patients submitted to repeated vaccinations.

The mean neutralizing titer was relatively high (10), but it must be noted that in the pool was included the serum of case no. 13, whose titer was above 125.

After the booster dose all sera were positive by CF, even those taken on the 7th day.

As can be seen, the study of the serum pools showed an increase of the neutralizing titer in the same period of time in which there was a decrease in the levels of antibodies detectable by CF. This finding, according to LE BELL et al.<sup>3</sup>, shows that SN remains positive for a longer period of time than CF, thus heightening the value of the positive results with the latter in the evaluation of anti-rabies immunity. With the first sample of the serum of patient no. 13, this relationship becomes quite evident: titers 2 and above 125 for CF and SN respectively.

The correspondence between these two tests as established by PEREIRA et al.<sup>6</sup> was always confirmed by our results.

### RESUMO

*Revacinação anti-rápica humana. II. Imunização preventiva com poucas doses e o efeito de apenas uma dose de reforço*

Os Autores estudaram o resultado da re-vacinação anti-rábica, com dose única de 2,0 ml, em pacientes vacinados há 13 meses com 5 doses. Empregaram a vacina do tipo Fuenzalida & Palacios, tendo encontrado resposta imune efetiva nos 28 casos estudados.

A avaliação do estado imunitário foi feita sempre por reação de fixação do complemento, sendo a soro-neutralização realizada na medida da disponibilidade de camundongos.

#### REFERENCES

1. ATANASIU, P. — Titrage des anticorps rabiques pratiqué sur les sérums humains. *Bull. Off. int. Epiz.*, **67**:383-387, 1967.
2. COHEN, D.; TIERKEL, E. S.; SIKES, R. K. & CHENS, S. M. — Antibody response to rabies booster inoculation in prophylactically immunized human volunteers. *Bull. Org. mond. Santé*, **31**:426-429, 1964.
3. LE BELL, I.; DEBOER, C. J.; HAZZ, E. L. & COX, H. R. — Complement fixing and neutralizing antibodies on human vaccinated against rabies. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **73**:225-228, 1950.
4. Organizacion Mundial de la Salud — Comite de Expertos de la OMS EN RABIA. 5.<sup>o</sup> informe, Genebra, 1966, n.<sup>o</sup> 321.
5. PEREIRA, O. A. C. — "Tese de Livre-Docência" presented to Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1969.
6. PEREIRA, O. A. C.; RAPHAELIAN, T. & COUTINHO, N. — Complement fixation test in evaluation of immunity against rabies. *Rev. Microbiol.*, **1**:85-91, 1970.
7. SHIPLEY, W. D. & JUBELT, H. P. — Rabies immunization for man. *J. Amer. vet. med. Ass.*, **153**:1771-1774, 1968.

Recebido para publicação em 20/7/1971.

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS FILAMENTOSAS GRAM POSITIVAS E AERÓBIAS DA CAVIDADE BUCAL

Luiz Carlos BIER<sup>(1)</sup> & Wilson Chagas de ARAUJO<sup>(2)</sup>

### RESUMO

Certos microrganismos, isolados dos vários nichos da cavidade oral, apresentam características de bactérias filamentosas (filamentos Gram positivos, facultativos).

Em geral, estas bactérias filamentosas também se apresentam como bastonetes curtos Gram positivos, lembrando a disposição de difteróides.

Mais recentemente, êstes microrganismos têm sido isolados de material para exame clínico (escarro, liquor, swab de nasofaringe); as características morfológicas, propriedades bioquímicas e fisiológicas permitem classificá-los como *Bacterionema matruchotii*, *Odontomyces viscosus* e *Rothia dentocariosa*.

Uma revisão da literatura foi realizada para analisar os pontos controvertidos dos vários estudos sobre as bactérias filamentosas, aeróbias, com a finalidade de estabelecer recursos práticos para isolamento e diferenciação (morfológica e bioquímica) destes microrganismos.

### INTRODUÇÃO

A cavidade oral contém uma microbiota anfibiônica bastante variada e muito concentrada em certas áreas.

Certos microrganismos, facultativos ou anaeróbios estritos, apresentam características morfológicas que podem variar em relação às condições de cultivo, surgindo então as chamadas formas filamentosas.

O campo de estudo é reconhecidamente amplo e a definição destas formas filamentosas está surgindo pouco a pouco com o interesse dos pesquisadores para elucidar os aspectos controvertidos da sistemática e da taxonomia destas formas pleomórficas.

#### *Bacterionema*

GILMOUR & col.<sup>27</sup>, após detalhada revisão da literatura sobre os microrganismos chamados *Leptotrichia* (*Leptothrix*) *buccalis*,

sugeriram a criação do gênero *Bacterionema*, para a família *Actinomycetaceae*, apresentando o gênero, as seguintes características: bactérias filamentosas, não septadas, longas, espessas, retilíneas ou encurvadas, com um corpo bacilar preso a uma extremidade; Gram positivas, reproduzindo-se por fragmentação; facultativas (ocasionalmente, algumas amostras são anaeróbias); mostram dicotomização na fase de microcolônias na superfície do ágar infuso (Brain Heart Infusion Agar), adicionado de extrato de levedura, quando as placas são incubadas em ambiente de 95,0% de nitrogênio e 5,0% de gás carbônico.

O novo gênero teria a espécie tipo *B. matruchotii* (MENDEL<sup>12</sup>) comb. nov. para o microrganismo originalmente descrito por KLIGLER<sup>11</sup>, GIES & KLIGLER<sup>24</sup>, como *Leptothrix buccalis*.

Parte deste trabalho foi extraído da tese de doutoramento de um dos autores (L.C.B.) apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.

(1) Professor-Assistente do Instituto de Microbiologia da U.F.S.M.

(2) Professor-Conferencista do C.N.Pq. no Instituto de Microbiologia da U.F.R.J., Rio de Janeiro, Brasil

A revisão mostrou também que diversos microrganismos da cavidade oral foram indiscriminadamente classificados como *Leptothrix* ou *Leptotrichia*, em consequência de estudos bacteriológicos incompletos e, principalmente, pela conceituação variada dos termos filamento e filamentoso. Certo microrganismo, por exemplo, com morfologia típica de bacilo e 10  $\mu$  de comprimento, dispondendo-se em longas cadeias, foi considerado como forma filamentosa e classificado como *Leptotrichia buccalis*. Outro microrganismo longo, espesso e não segmentado, apresentando também um corpo bacilar numa das extremidades, foi, inicialmente, classificado como *Leptothrix buccalis* por KLICLER<sup>41</sup> e, posteriormente, por BULLEID<sup>10</sup>; porém, microrganismo semelhante foi classificado por outros investigadores como *Leptotrichia buccalis*<sup>3, 5, 6, 30, 43, 47</sup>.

Estas bactérias filamentosas aparecem na literatura com outros nomes: MENDEL<sup>42</sup> classificou-as como *Cladotrichia matruchotii*; DAVIS & BAIRD-PARKER<sup>14, 15</sup> e BAIRD-PARKER & DAVIS<sup>2</sup> deram-lhes o nome de *Leptotrichia dentium*; FENNEL<sup>18</sup> deu-lhes o nome de *Streptothrix interproximalis*.

A sugestão de GILMOUR & col.<sup>27</sup> foi motivada por estudos anteriores, nos quais o isolamento e as características bioquímicas dos filamentos Gram positivos, facultativos e ramificados, isolados de matéria alba, placa dental, tártaro e lesão cariosa, foram analisados minuciosamente por GILMOUR & HUNTER<sup>25</sup> e depois por GILMOUR & BECK<sup>26</sup>.

Para isolamento do microrganismo, alíquotas de várias diluições do material foram semeadas, em profundidade, em ágar-infuso de cérebro-coração e na superfície de ágar-sangue, ambos suplementados com extrato de levedura (0,2%), incubando-se as placas em condições de aerobiose e anaerobiose (95,0% de nitrogênio + 5,0% de gás carbônico). Várias vezes, colônias já isoladas, foram espalhadas novamente na superfície do ágar-infuso, adicionado de extrato de levedura e glicose (1,0%), como recurso escrupuloso para obterem culturas puras. Diferentes tipos coloniais foram observados, variando com a composição do meio sólido empregado e com as condições de incubação: em profundidade, as colônias pareciam uma bola de cabelos; na superfície das placas de ágar-sangue, incubadas em anaerobiose, as colônias eram planas, rizóides, translúcidas, e com a parte central elevada; ainda na superfície, porém no ágar-infuso com extrato de levedura e glicose, algumas colônias eram rizóides e planas, enquanto outras eram

circulares, convexas, com bordas irregulares, provocadas talvez pelo aparecimento de formas filamentosas; em anaerobiose, apareciam colônias semelhantes àquelas descritas no isolamento em profundidade; também apareciam colônias que tinham as bordas elevadas e arredondadas, com a parte central escavada. Uma das amostras isoladas apresentou ainda colônias cônicas, opacas, butirrosas, radiadas, quando espalhadas sobre a superfície do ágar-infuso de cérebro-coração.

No exame bacteroscópico das culturas, os microrganismos pareciam filamentos, não septados, com um corpo bacilar preso a uma das extremidades, embora também aparecessem apenas filamentos, às vezes apenas o corpo bacilar, ou vários filamentos ligados a um corpo bacilar.

Entretanto, as características morfológicas das células eram consistentemente diferentes, dependendo das condições de incubação aerobiose ou anaerobiose: a ramificação era rara em anaerobiose; o aparecimento de longos filamentos era influenciado pela atmosfera de anaerobiose; o diâmetro e o comprimento das células eram maiores, quando as culturas eram incubadas em anaerobiose<sup>26</sup>.

A observação de microcolônias, na superfície de placas incubadas em aerobiose, mostrou que o filamento apresentava certa dicotomização ou ramificação; inicialmente, não havia aparecimento de septo, mas, com a observação paciente e continuada do crescimento das células, era possível notar a ocorrência de septo no ponto de ramificação das células.

No isolamento inicial, o filamento exigia reduzida tensão de oxigênio, porém, após vários cultivos, o microrganismo crescia em aerobiose e em anaerobiose<sup>25</sup>. Trinta e quatro amostras foram inoculadas em ágar-camada alta (shake tube) com o objetivo de analisar-lhes o tipo respiratório; 30 amostras foram consideradas facultativas, porque cresceram ao longo da coluna; duas cresceram apenas na superfície, e duas, apenas na porção inferior da coluna sólida. Entretanto, estas 4 amostras tinham comportamento de bactéria facultativa, quando eram semeadas na superfície de ágar-infuso e eram incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose. Segundo GILMOUR & BECK<sup>26</sup>, estes filamentos cresciam em aerobiose e anaerobiose, porém o crescimento era mais intenso, quando as culturas eram incubadas na presença de oxigênio.

Para estudo da fermentação, 55 amostras do filamento foram inoculadas em meio básico, contendo azul de bromotimol (0,001%) e 1,0% do substrato-teste, esterilizado por filtração ou tindalização. Tôdas as amostras foram incubadas em aerobiose, mas 11 amostras foram inoculadas em duplicata, de modo a serem incubadas, também, em condições de anaerobiose. A leitura foi realizada diariamente, anotando-se a alteração do indicador e, após duas semanas, o pH foi determinado no potenciômetro. Tôdas as amostras fermentaram glicose, frutose, sacarose e maltose, com pH final variando de 4,7 a 5,2. A manose foi fermentada por 54 amostras cultivadas em aerobiose e por 11 amostras em anaerobiose. A salicina foi fermentada por 51 e por 9 amostras, cultivadas em aerobiose e anaerobiose, respectivamente. Os autores consideram 15 amostras como fermentadoras lentas, e ainda relataram o comportamento divergente de 3 amostras entre dois testes de fermentação. De 55 amostras incubadas em aerobiose, 19 fermentaram lentamente a rafinose, após duas semanas de incubação, enquanto 5 das 11 amostras, cultivadas em anaerobiose, fermentaram a rafinose. O manitol foi fermentado por 7 amostras incubadas em aerobiose e por duas incubadas em anaerobiose. Três amostras fermentaram a trealose em condições de aerobiose; nenhuma fermentou a trealose em anaerobiose. Nenhuma amostra fermentou lactose, arabinose, xilose, galactose, alfa-metil-glicosídio, ramnose, melibiose, celobiose, inulina, glicerol, sorbitol e dulcitol.

As amostras de filamentos não hidrolisaram gelatina, não produziram indol. Tôdas reduziram nitrato a nitrito, eram catalase positivas, produziram acetoina a partir da glicose, hidrolisaram o hipurato de sódio e o amido, produziram amônio a partir da arginina. A esculina foi hidrolisada por 48 das 55 amostras estudadas em aerobiose e pelas 11 incubadas em anaerobiose.

HOWELL JR. & PINE<sup>32</sup>, posteriormente, estudaram as propriedades fisiológicas de 43 amostras de filamentos com aspecto morfológico bem semelhante, com o objetivo de ampliar os conhecimentos sobre os microrganismos sugeridos para o novo gênero *Bacterionema*.

Estes autores relataram que nenhuma amostra alterou o leite tornassolado, nem cresceu em meio baleado (10,0%). Nenhuma amostra hidrolisou a gelatina, nem produziu indol. De 36 amostras estudadas, 8 cresceram em caldo com 4,0% de cloreto de sódio, mas nenhuma cresceu na concentra-

ção de 6,5%. Tôdas as amostras reduziram nitrato a nitrito. Cérca de 33 amostras (37 foram estudadas) deram o teste de Voges-Proskauer positivo, empregando-se a solução de creatina (0,3%) em 40,0% de hidróxido de potássio<sup>12</sup>. Tôdas as amostras foram catalase positivas. Algumas amostras, quando cultivadas em meio de leite com tornassol e carbonato de cálcio, mostraram grânulos álcool-ácido resistentes no interior das células.

No aspecto respiratório, os autores relataram que 33 amostras, cultivadas em meio com hidrolisado de caseina (4,0 mℓ/L) e extrato de levedura (0,025%), eram essencialmente aeróbias, embora muitas amostras pudesse apresentar um limitado crescimento em condições de anaerobiose, obtidas pelo emprêgo de tubos com carbonato de sódio e pirogalol.

A utilização de carboidrato e ácidos orgânicos foi estudada, comparando a intensidade de crescimento dos microrganismos no meio básico (previamente testado nas provas de respiração) e na presença dos substratos-teste. Apenas glicose, sacarose, maltose, acetato, lactato e piruvato permitiram a densidade ótica igual ou superior a 1,11; na presença de outros substratos (foram empregados 18 carboidratos e 8 ácidos orgânicos), a intensidade de crescimento não diferia daquela encontrada no meio básico. O citrato, por exemplo, teve ação inibitória sobre as 12 amostras testadas. A produção de ácidos foi anotada, quando as amostras eram cultivadas na presença da glicose e sacarose, pois o pH do meio abaixava além de 0,5 unidades.

Muitas amostras abaixavam o pH do meio também na presença de maltose e salicina, apenas quando o meio básico de caseína era substituído pelo Nutrient Broth Medium (Difco), suplementado com 0,2% de extrato de levedura.

As amostras foram cultivadas no caldo com hidrolisado de caseína e extrato de levedura, e a reação do meio foi estabelecida dentro de uma faixa variável de pH, com a finalidade de determinar os limites de seu crescimento. Os filamentos não cresceram no pH 5,9 e 7,9. O crescimento foi considerado excelente no pH 6,1; 6,5; 7,0 e 7,4, nos quais a densidade ótica era respectivamente 1,57; 1,70; 1,71 e 1,49.

Quatro das amostras, isoladas originalmente por Gilmour, foram cultivadas na presença da glicose, para determinar os produtos de sua fermentação. Em microaerofilia, o ácido lático era o produto mais abundante, embora também aparecessem ácido fórmico,

acético, propiônico, succínico e gás carbônico. Em aerobiose, uma amostra formou ácido lático e duas produziram ácido acético e ácido propiônico.

### *Odontomyces*

KEYES & JORDAN<sup>40</sup> relataram que hamsters (*Cricetus auratus*) das variedades golden e cream, da criação do National Institute of Health (Animal Production Center), apresentavam certo tipo de doença periodontal quando consumiam uma dieta com elevado teor de carboidrato. A variedade albino não apresentava o quadro periodontal, mesmo quando consumia a dieta adicionada de carboidrato. Entretanto, a doença periodontal se instalava, nestes animais não infectados, quando eram inoculados com a placa dental que se depositara sobre a margem gengival dos animais golden ou cream e se lhes oferecia uma dieta rica em carboidratos.

No exame histopatológico, os autores observaram formas filamentosas localizadas profundamente na bolsa periodontal, às vezes invadindo a superfície da raiz, produzindo alterações que podiam ser classificadas como cárie de raiz.

Nos animais com doença periodontal, havia um depósito abundante, aderente, com características de placa dental subgengival, que aparecia após o consumo da dieta rica em carboidrato. JORDAN & KEYES<sup>38</sup> isolaram, deste depósito, estreptococos, bacilos Gram negativos não identificados e certos filamentos pleomórficos, ramificados, Gram positivos, catalase positivos, e não álcool-ácido resistentes. Apenas estes filamentos, quando inoculados nos hamsters da variedade albino, consumindo a dieta contendo 56,0% de sacarose, produziram a alteração periodontal. Os descendentes destes animais apresentaram, espontaneamente, típica alteração periodontal, como fôra observada nos roedores golden e cream sob ação da dieta rica em sacarose. Estas observações levaram os autores a considerar a doença periodontal nos "hamsters" como uma doença infeciosa e transmissível, na qual a bactéria filamentosa era o componente microbiano necessário.

Anteriormente, ORLAND<sup>46</sup> e HURST<sup>36</sup>, estudando a microbiota oral de hamsters, isolaram uma bactéria filamentosa, pleomórfica, também aerobia e Gram positiva, cujas colônias apresentavam a variação lisa-rugosa tão comum a outros microrganismos.

HOWELL JR. & col.<sup>34</sup> fizeram um estudo minucioso sobre a morfologia e a bioquímica do microrganismo isolado dos "hamsters", cujos resultados conduziram à proposição de gênero e espécie novos para classificar o referido microrganismo. O filamento foi chamado *Odontomyces viscosus*, pertencendo à família *Actinomycetaceae*.

Microrganismo semelhante foi isolado por JORDAN & KEYES<sup>39</sup>, da cavidade oral de ratos submetidos à dieta cariogênica.

Desde o isolamento, a partir da placa gengival dos hamsters, HOWELL JR. & col.<sup>34</sup> consideraram o microrganismo como pertencente à família *Actinomycetaceae*, embora apenas as características morfológicas e algumas propriedades fisiológicas estivessem estudadas. O microrganismo não poderia ser classificado como *Nocardia*, porque não formava hifa aérea, não esporulava, era facultativo e não apresentava a capacidade oxidativa tão peculiar naquela gênero. O filamento isolado dos roedores estava relacionado com os microrganismos do gênero *Actinomyces*, considerando a morfologia celular, o metabolismo facultativo, a fermentação da glicose com produção de ácido lático e traços de ácido fórmico, ácido acético, ácido succínico, a exigência de CO<sub>2</sub> e ainda a composição da parede celular. Entretanto, o gênero *Actinomyces* era então constituído de microrganismos catalase negativos, microaerófilos ou anaeróbios, características que diferiam bastante das do microrganismo isolado da placa gengival dos hamsters.

As características morfológicas e as propriedades bioquímicas do *Odontomyces viscosus* foram descritas detalhadamente em dois trabalhos, publicados sucessivamente por HOWELL JR.<sup>29</sup> e HOWELL JR. & JORDAN<sup>33</sup>.

Para isolamento do microrganismo, HOWELL JR.<sup>29</sup> coletou material de bolsa periodontal, de placa periodontal e de sulco gengival de 48 hamsters. O material foi homogeneizado e diluído em solução de cisteína neutralizada (0,05%), seguindo-se a semeadura em ágar-sangue, adicionado de extrato de carne, amido e fucsina básica (1:1.000.000). As placas foram incubadas em aerobiose e em anaerobiose, em jarra tipo Brewer com atmosfera de 95,0% de nitrogênio e 5,0% de gás carbônico.

Cerca de 167 amostras foram isoladas, 95 das placas incubadas em aerobiose e 75 das placas incubadas em anaerobiose. Em aerobiose, as colônias tinham menos de 0,5 mm de diâmetro, eram convexas ou cônicas, cinzas ou brancas, com superfície lisa ou granular, com bordas ligeiramente onduladas ou

lobadas. Em anaerbiose, as colônias tinham de 0,5 mm a 1,0 mm de diâmetro, eram ovais ou circulares, ligeiramente convexas ou elevadas, com bordas lobadas ou denteadas, e, usualmente, eram circundadas por uma zona de filamentos. A microcolônia observada com lente de imersão mostrava a ramificação do filamento.

Esfregaços corados pelo Gram, a partir de cultura em tioglicolato, com 20,0% de infuso de carne de cavalo, mostraram longos e sinuosos filamentos Gram positivos, de extremidades ligeiramente afiladas ou apresentando a forma de raquete que, posteriormente, podiam dicotomizar. Com frequência, a forma de longos bastonetes também aparecia nos esfregaços.

Os filamentos eram essencialmente aeróbios, embora pudesse crescer em microaerofilia, exigindo CO<sub>2</sub> para permitir um crescimento abundante em vários meios nutritivos.

A fisiologia e as características bioquímicas do *Odontomyces viscosus* foram estudadas por HOWELL JR. & JORDAN<sup>33</sup> com 62 amostras isoladas de hamsters. Apenas glicose, levulose, maltose, sacarose, lactose, galactose, manose, rafinose, inositol e salicina foram fermentados pelas amostras isoladas dos roedores. Não fermentaram inulina, manitol, glicerol, sorbitol, ramnose, ribose, arabinose e xilose. Todas as amostras testadas (24) hidrolisaram o amido. Ácido láctico foi o produto mais abundante na fermentação da glicose; traços de ácido acético, fórmico, succínico também foram encontrados.

O microrganismo crescia na presença de piruvato de sódio; não crescia na presença de citrato ou benzoato de sódio. O teste de Voges-Proskauer foi negativo. A gelatina não foi hidrolisada. Não produzia indol nem gás sulfídrico. O nitrato era reduzido a nitrito. O microrganismo era catalase positivo e não era hemolítico.

Outra característica interessante do *O. viscosus* foi relatada por HOWELL JR. & JORDAN<sup>35</sup>: a partir da sacarose, o microrganismo sintetiza levana, o que pode explicar a capacidade do microrganismo formar placa gengival nos hamsters.

Recentemente, GEORG & col.<sup>20</sup> propuseram a classificação do *Odontomyces viscosus* como *Actinomyces viscosus*, considerando as recomendações do Sub-Grupo de Taxonomia de *Actinomyces* Microaerófilos, para incluir microrganismos catalase positivos entre os microrganismos do gênero *Actinomyces*.

Na mesma época, GERENCER & SLACK<sup>21</sup> surpreenderam com o relato do isolamento de *O. viscosus* do táraro dentário e de escarro, pois os estudos já realizados, pareciam sugerir que este microrganismo fosse o fator microbiano indispensável para aparecimento da doença periodontal observada, quando os roedores consumiam dieta com sacarose.

#### *Nocardia* e *Rothia*

Na opinião de BURNETT & SCHERP<sup>11</sup>, os microrganismos, com aspecto filamentoso, ramificados, aeróbios, Gram positivos, catalase positivos, com forma de cocos ou de díteróides, isolados da cavidade oral, são geralmente classificados como *Nocardia*.

Entretanto, na descrição minuciosa sobre 59 espécies de *Nocardia*, feita por WAKSMAN<sup>53</sup>, não há referência a isolamento de qualquer das espécies mencionadas da cavidade oral humana. No final do capítulo, o autor referiu-se, com brevidade, sobre um actinomiceto aeróbio isolado da bôca por DAVIS & FREER<sup>16</sup>, ao qual deram o nome de *N. saliva*.

RITZ<sup>48, 49</sup>, estudando a composição microbiana da placa dental de 6 pacientes, numa tentativa de observar as alterações ocorridas em depósitos de diferentes idades, relatou que o número de *Nocardia* decrescia juntamente com o de *Streptococcus* e *Neisseria*. O critério de reconhecimento de *Nocardia*, no referido estudo, foi o isolamento de bastonetes Gram positivos aeróbios em meio seletivo com gluconato e polimixina B.

BISSET & DAVIS<sup>8</sup> consideraram o gênero *Nocardia* muito versátil, porque nela estão localizadas muitas amostras isoladas da cavidade oral, não havendo porém informação suficiente para caracterizar espécies. As características das nocardias, apresentadas pelos autores ingleses, são vagas e, na realidade, não permitem distinguir *Nocardia* de *Corynebacterium*, que, segundo êles, convergem morfológicamente: "filamentos Gram positivos longos ou médios, não permanentemente ramificados; as células são uniformes em tamanho; metabolismo variável; embora aeróbios por definição, não é certo que todas as amostras produzem catalase; as amostras isoladas da cavidade oral são ativamente sacarolíticas ou quase completamente não sacarolíticas; as características culturais são também variáveis, mas muitas amostras crescem bem em meios artificiais; as colônias são frequentemente grandes e podem ser pigmentadas".

MORRIS<sup>43</sup>, em exaustivo estudo sobre a bacteriologia da cavidade oral, isolou 97 amostras de *Nocardia*, representando 27 diferentes tipos, distribuídos em 8 grupos arbitrários, segundo os resultados das provas de fermentação. O autor teve muita preocupação em demonstrar a falta de uniformidade no comportamento bioquímico das amostras isoladas, e, por outro lado, não houve qualquer tentativa de atribuir uma nomenclatura às espécies provavelmente existentes.

Quanto ao aspecto morfológico, duas formas foram anotadas pelo autor: tipo A que produzia microcisto pequeno, com aproximadamente 1  $\mu$  de diâmetro, germinando para produzir longos filamentos; tipo B apresentava microcistos maiores e os filamentos eram espessos, com a forma de clava; em cultivos sucessivos perdiam a capacidade de formar filamentos, de tal forma que poderiam ser confundidos com *Corynebacterium*. As amostras com morfologia do tipo A eram sacarolíticas, enquanto entre as do tipo B haviam amostras sacarolíticas e, também, amostras não sacarolíticas.

Fundamentado exclusivamente em seus resultados, Morris concluiu que as nocardias eram microrganismos da flora normal da boca, apesar de, anteriormente, os autores não terem feito qualquer referência a tais microrganismos, talvez porque muitas amostras classificadas como *Actinomyces* fossem de fato *Nocardia*.

Segundo ROTH<sup>51</sup>, vários autores isolaram bacilos pleomórficos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram positivos, que seriam *Nocardia*, porém foram chamados *Actinomyces*<sup>3, 7, 13, 17, 36</sup>.

Em 1949, ONISI<sup>44</sup> estudou 36 amostras de microrganismos filamentosos, Gram positivos, isolados de lesão cariosa. Inicialmente, isolado em meio sólido, o microrganismo tinha o aspecto de filamento ramificado, com as extremidades em clava. Após 8 dias de cultivo, o microrganismo apresentava a forma cocóide. As colônias eram, inicialmente, elevadas com superfície rugosa, porém apresentavam colônias lisas, após várias sub-culturas. Em meio líquido, a forma rugosa produzia crescimento granular, enquanto a colônia lisa produzia a turvação do caldo. Como as amostras tinham características semelhantes a outros *Actinomyces* da boca, foram consideradas como pertencentes a ordem *Actinomycetales*, sugerindo Onisi, a nomenclatura *Actinomyces dentocariosus*.

Em estudo subsequente, ONISI & NUCKOLLS<sup>45</sup> relataram que as amostras de *A.*

*dentocariosus* eram catalase positivas, hidrolisavam a gelatina, reduziam o nitrato, fermentavam glicose, maltose e inulina, produzindo somente ácidos.

Em 1957, ROTH<sup>51</sup> isolara, de lesões de cárie de 104 dentes, 102 amostras de microrganismos capazes de agir sobre colágeno desnaturalizado, e que foram distribuídos em 5 grupos, de acordo com suas características morfo-fisiológicas. Cerca de 20 amostras, que constituíam seu grupo I, eram bem semelhantes aos microrganismos estudados anteriormente por Onisi, porém, como o tipo respiratório variava de aeróbios à anaeróbios facultativos, Roth classificou-as como *Nocardia*, com o nome de *Nocardia dentocariosus*.

Posteriormente, ROTH & THURN<sup>52</sup> estudaram amostras de *N. dentocariosus* isoladas de lesão de cárie, procurando estabelecer um critério padrão para caracterizar *Nocardia* e também desenvolver um meio seletivo para facilitar seu isolamento. Dentes cariados, recentemente extraídos, foram envolvidos em gaze estéril e imediatamente quebrados com auxílio de martelo cirúrgico. Alguns pedaços foram colocados em meio nutritivo, para homogeneização durante 10 min. (agitação mecânica), seguindo-se diluições decimais do material até 10<sup>-6</sup>. Aliquotas das diluições foram semeadas, em duplicata, na superfície de ágar-verde-bromo-cresol (neopeptona 1,0%, ágar 1,5%, gelatina 1,0%, verde-bromo-cresol 1:25,000; pH final 6,8), seguindo-se a incubação das placas em aerobiose e em anaerobiose até 5 dias.

O meio usado com propósito seletivo não ofereceu resultado satisfatório, porque aparecia sempre grande número de colônias lisas de *Streptococcus* que dificultava o isolamento de *Nocardia*.

De um modo geral, as amostras estudadas mostraram variação na morfologia celular (forma cocóide ou filamento) e colonial (variação S — R). Segundo os autores, não se pode confiar nos testes-padrão usados rotineiramente; a conclusão talvez seja derivada da variabilidade do teste hidrólise da gelatina empregado na investigação. As amostras de *N. dentocariosus* foram inoculadas em três meios distintos: a) nutrient agar (Difco) com 12,0% de gelatina, para leitura após 5 dias de incubação à 37°C, com auxílio da solução de bicloreto de mercúrio; b) nutrient gelatin (Difco) cujos tubos foram incubados à 37°C, durante 30 dias; c) gelatina (12,0%) com neopeptona (1,0%), adicionando-se também CaCO<sub>3</sub> para manter o pH do meio (incubação dos

tubos à 37°C, 30 dias). Os resultados mostraram que, no primeiro teste, 36,0% das amostras hidrolisaram a gelatina; no segundo, 43,0% das amostras hidrolisaram, e, finalmente, no meio tamponado, todas as amostras hidrolisaram a gelatina.

Informação interessante sobre espectro de sensibilidade das amostras de *N. dentocariosus* aos vários antibióticos (discos Difco) foi também relatada no estudo de ROTH & THURN<sup>32</sup>. Os microrganismos mostraram sensibilidade à aureomicina, cloromicetina, estreptomicina, eritromicina, penicilina, terramicina, tetraciclina, bacitracina, kanami-

cina, magnamicina, novobiocina, oleandomicina, mandelamina, ristocetina, espiramicina, furadantina, furacin, vancomicina e estafacicilina. Houve inibição parcial pela polimixina B, neomicina e ácido para-aminosalicílico.

DAVIS & FREER<sup>16</sup>, desenvolvendo um esquema para isolamento de *Leptotrichia dentium* da saliva e de matéria alba, isolaram 25 amostras de actinomicetos aeróbios às quais chamaram de *Nocardia salivae*. Os autores aplicaram os testes sugeridos por HOWELL JR. & col.<sup>31</sup> para estudo de *Actinomyces*, relatando que as amostras de *N.*

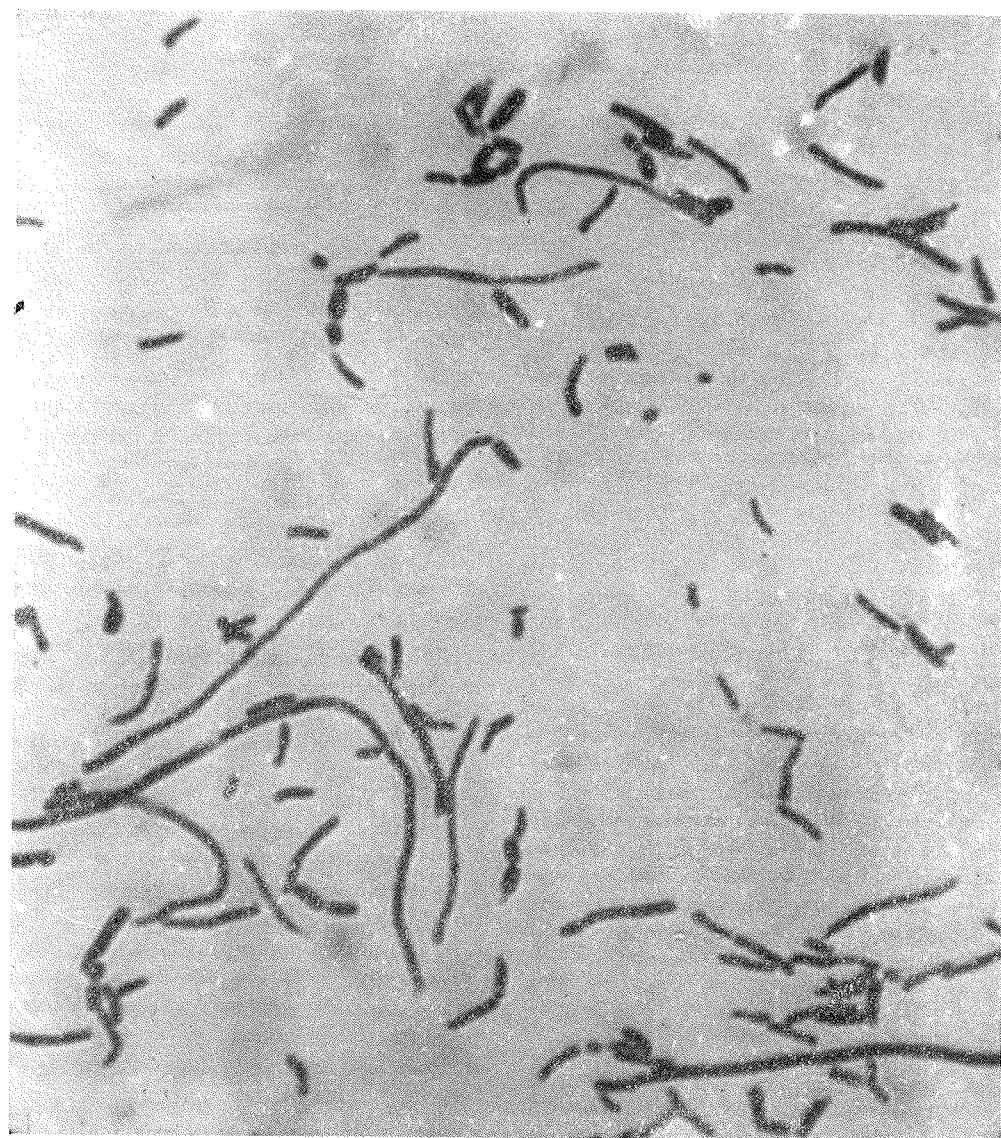


Fig. 1 — Bacterioscopia da amostra de *Bacterionema matruchottii* (ATCC 14266). Esfregaço corado pelo Gram: presença de longos filamentos com um corpo bacilar numa extremidade. Aumento 550X.

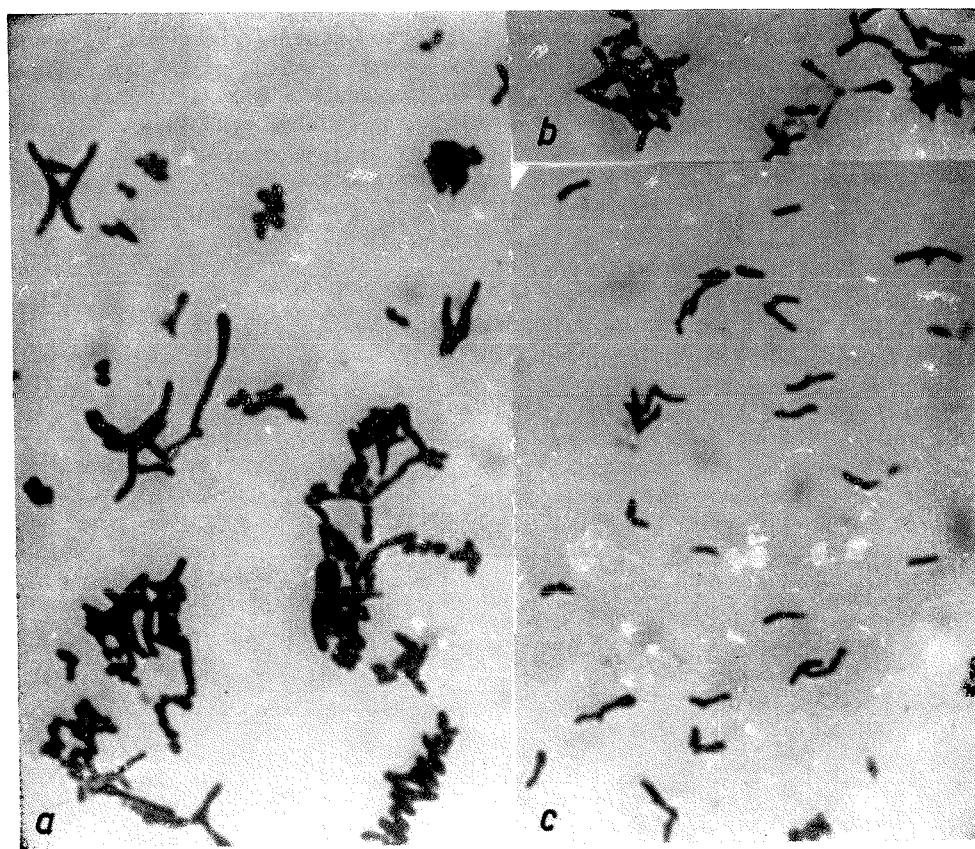


Fig. 2 — Bacterioscopia de amostra de *Rothia*, isolada do sulco gengival humano. Esfregão corado pelo método de Gram (Kopeloff-Beerman): a) alguns filamentos apresentam extremidade intumescida; formas semelhantes a difteróides; b) dicotomização em Y; c) bastonetes retilineos e encurvados. Aumento 550X.

*salivae* eram catalase positivas, reduziam nitrato, produziam acetoina, não produziam indol, não cresciam em meio com bile, fermentavam glicose, maltose, sacarose e glicerol; não fermentavam rafinose, lactose, inositol, salicina, inulina, manitol, xilose, arabinose e melitose. As características morfológicas (celular e colonial), culturais e bioquímicas permitiam classificar as 25 amostras como *Nocardia*, entretanto, a análise cromatográfica da composição química da parede celular mostrava que as amostras estavam mais relacionadas com as amostras de *Actinomyces* testadas na mesma oportunidade.

WINFORD & HABERMAN<sup>54</sup> isolaram, de fragmentos de gengiva, 17 amostras de filamentos Gram positivos cuja morfologia era muito semelhante à descrição de BISSET & DAVIS<sup>8</sup> para *Nocardia*, e cujas características bioquímicas permitiram classificar as amostras isoladas como *Nocardia salivae*. Entretanto, as amostras de WINFORD & HABERMAN<sup>54</sup> fermentaram xilose e salicina, en-

quanto as 25 amostras de *N. salivae* estudadas por DAVIS & FREER<sup>16</sup> não utilizaram estes carboidratos.

Mais recentemente, GEORG & BROWN<sup>19</sup> re-estudaram muitas das amostras de Roth, algumas do trabalho de DAVIS & FREER<sup>16</sup> e várias amostras semelhantes ao microrganismo de ONISI<sup>44, 45</sup>, isoladas de materiais clínicos no Actinomyces Laboratory, CDC Mycology Unit, Atlanta, Georgia. Os autores concluíram, inicialmente, que as amostras de *N. dentocariosus* e *N. salivae* eram idênticas. Consideraram, também, que tais microrganismos não seriam apropriadamente classificados como *Nocardia* ou *Actinomyces*, propondo, então, o gênero *Rothia*, para classificação destes filamentos na espécie *R. dentocariosus*.

Ainda no mesmo trabalho, GEORG & BROWN<sup>19</sup> descreveram as principais características da espécie-tipo *R. dentocariosus* (Onisi) comb. nov. Os microrganismos apresentam micélio constituído de filamentos ramifi-

ficados, com extremidades em clava, fragmentando em formas cocóides e bacilares. Não produzem hifas aéreas. São exigentes de nitrogênio orgânico. São Gram positivos, não álcool-ácido-resistentes, imóveis. Crescem pouco em meio com piruvato, lactato ou acetado. São aeróbios ou microaerófilos. Crescem muito pouco ou não crescem em anaerobiose. Não são exigentes de CO<sub>2</sub>. Fermentaram frutose, glicose, maltose, sacarose e glicerol. Ácido lático é o principal produto resultante da fermentação da glicose, ocorrendo também a produção de ácido acético e uma pequena quantidade de ácido succínico. Dão o teste de Voges-Proskauer positivo. Hidrolisam a gelatina. Reduzem o nitrato a nitrito. Não produzem indol. São catalase positivos.

Revendo, mais uma vez, o extenso trabalho de MORRIS<sup>43</sup>, parece que os microrganismos do grupo 7 apresentam características fisiológicas bem semelhantes às de *R. dentocariosus*, descritas acima, embora aquelas amostras, distribuídas em 6 tipos, dessem o teste de Voges-Proskauer consistentemente negativo.

Mais recentemente, BROWN & col.<sup>9</sup> estudaram amostras de *R. dentocariosa*, isoladas em rotina bacteriológica, observando o comportamento de 50 culturas em 28 testes diferentes, numa tentativa de selecionar um esquema prático e rápido para caracterizar o microrganismo. Como tinham isolado *R. dentocariosa* de materiais clínicos de origem humana com muita frequência, o propósito



Fig. 3 — Bacterioscopia da amostra de *Odontomyces*, isolada do sulco gengival humano. Esfregaço corado pelo método de Gram (Kopellof-Beerman): presença de formas filamentosas, às vezes com extremidades intumescidas; algumas formas de bastonetes curtos lembram a disposição dos difteroides. Aumento 550X.

dos autores revestia-se de muita importância pela possibilidade de diferenciar *Rothia* de outros microrganismos semelhantes no aspecto morfológico — *Actinomyces* e *Nocardia* — que apresentam espécies comprovadamente patogênicas. O esquema de caracterização, porém, ficou limitado às provas positivas ao nível de 100,0% das amostras; todas as amostras de *Rothia* eram catalase positivas; reduziram nitrito a nitrito, hidrolisaram esculina, produziram ácido a partir da glicose, sacarose, maltose, salicina e glicerol.

Inicialmente, GEORG & BROWN<sup>19</sup> chamarão a espécie-tipo de *Rothia dentocariosus* e, em 1969, BROWN & col.<sup>9</sup> passaram a denominá-las de *Rothia dentocariosa*. A alteração vem atender à recomendação do Código Internacional de Nomenclatura<sup>37</sup>, segundo o qual o epíteto de uma espécie pode ser um adjetivo que deve concordar gramaticalmente com o nome do gênero. Assim, quando os autores atribuíram ao gênero o nome feminino *Rothia*, a espécie deveria corretamente se chamar *dentocariosa*.

## T A B E L A I

Isolamento e características morfológicas das bactérias filamentosas Gram positivas e aeróbias da cavidade oral

<i>Bacterionema</i>	
Isolamento	BHI ágar + 0,2% ext. levedura BHI ágar + 0,2% ext. levedura + 1,0% glicose Ágar-Sangue + 0,2 ext. levedura
Incubação	aerobiose ou anaerobiose (95,0% nitrogênio + 5,0% CO <sub>2</sub> ) em jarra de Brewer
Tipo colonial	colônias rizóides, planas ou circulares, convexas, bordas irregulares; às vezes, colônias com bordas elevadas e arredondadas, com parte central escavada
Bacterioscopia	filamentos Gram positivos com corpo bacilar preso a uma extremidade

<i>Odontomyces</i>	
Isolamento	Agar-Sangue + ext. carne + amido + fucsina básica (10 <sup>-6</sup> ). "Beef Heart Infusion" adicionado de proteose-peptona 1,0%, glicose 0,2%, ClNa 0,5%, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,25%, "phytone" 0,3%, ext. levedura 0,2% e ágar 1,5%
Incubação	idêntica à anterior
Tipo colonial	colônias circulares, convexas, borda inteira, superfície lisa, butirosa

<i>Rothia</i>	
Isolamento	semelhante ao anterior
Incubação	semelhante ao anterior
Tipo colonial	colônias irregulares, convexas de superfície rugosa, quebradica
Bacterioscopia	semelhante ao anterior

Estas bactérias filamentosas são bastante pleomórficas, podendo apresentar, frequentemente, forma semelhante a difteróide e trazer certa dúvida durante a bacterioscopia, quanto à pureza da cultura em exame.

De um modo geral, a expressão difteróide, mesmo nos trabalhos mais recentes, vem rotulando bacilos Gram positivos, aeróbios, cujas características bioquímicas, bem heterogêneas, não possibilitam uma classificação. Segundo GERENCER & SLACK<sup>21</sup>, esta tendência dos laboratórios para chamar de difteróide todos os bacilos Gram positivos pleomórficos, é motivada pela grande dificuldade em classificar as amostras isoladas de várias fontes.

Assim, no estudo da microbiota de sulco gengival de adultos<sup>22</sup>, de pré-escolares<sup>1</sup>, de placa dental<sup>23</sup> e de língua<sup>24</sup>, empregando meio não seletivo e condições de anaerobiose para incubação das placas, havia sempre certa percentagem de culturas de bacilos Gram positivos, pleomórficos, facultativos, cujas propriedades bioquímicas e fisiológicas não permitiam uma classificação. Em todos os casos, este grupo heterogêneo foi chamado de difteróide, significando apenas um rótulo indefinido no laboratório, aguardando re-

ursos mais aprimorados que permitam a classificação destes bastonetes Gram positivos pleomórficos.

RESEBURY<sup>50</sup> coletou, exaustivamente, dados sobre todos microrganismos da flora normal do hospedeiro humano, elaborando um excelente livro de referência para qualquer estudo sobre a microbiota oral. Em relação aos difteróides aeróbios, as informações são muito superficiais e escassas, refletindo o conteúdo da literatura sobre o assunto.

O problema parece antigo, porque 30 anos são passados desde que BIBBY<sup>4</sup>, fazendo uma revisão sobre a microbiota oral e sua relação com os processos mórbidos da boca, mostrou que não existiam duas descrições semelhantes para os difteróides isolados da boca.

As fotografias apresentadas em sequência documentam o aspecto bacterioscópico das bactérias filamentosas — *Bacterionema*, *Odontomyces*, *Rothia* — isoladas da cavidade oral e que podem, também, ser isoladas de material clínico (escarro, líquor, swab do narso-faringe, etc.). Além da apresentação filamentosa, com muita frequência aparecem formas de bastonetes curtos, lembrando a disposição dos difteróides.

T A B E L A II

Características bioquímicas das bactérias filamentosas Gram positivas e aeróbias da cavidade oral

Teste	<i>Bacterionema</i>	<i>Odontomyces</i>	<i>Rothia</i>
Catalase	+	+	+
Redução NO <sub>3</sub>	+	+	+
Redução NO <sub>2</sub>	-	+	+
H <sub>2</sub> S	-	- (1)	-
Indol	-	-	-
VM	+	+	+
VP	+	-	+
Hidrolise gelatina	-	-	-
Hidrolise amido	+	+	-
Lactose	-	+	-
Galactose	-	+	-
Arabinose	-	+ (2)	-
Inositol	- (3)	+	-
Rafinose	-	+	-
Inulina	- (4)	+	-
Trealose	-	+	+
Glicerol	-	+	+

(1) Gerencser & Slack<sup>21</sup> relataram H<sub>2</sub>S positivo quando empregavam "Triple Sugar Iron Agar".

(2) Gerencser & Slack<sup>21</sup> não observaram fermentação da arabinose em 19 amostras isoladas de pacientes, quando empregaram o meio de tioglicolato (sem dextrose), adicionado de extrato de levedura (livre de dextrose) e púrpura de bromocresol.

(3) Gilmour & Beck<sup>20</sup> relataram que 19 amostras (55 testadas) fermentaram lentamente a rafinose.

(4) Gilmour & Beck<sup>20</sup> relataram que 3 amostras (55 testadas) fermentaram a trealose.

As Tabelas I e II apresentam uma sinopse dos recursos práticos para isolamento e caracterização das bactérias filamentosas, aeróbias, pleomórficas, isoladas da cavidade oral e de materiais clínicos.

## SUMMARY

*Isolation and characterization of filamentous Gram positive aerobic bacteria from the oral cavity*

Gram positive, aerobic, filamentous microorganisms, also displaying diphtheroidal forms are commonly isolated from human oral cavity.

These filamentous organisms have been also isolated from other human clinical sources (sputum, blood, spinal fluids, abscesses, etc.), and they display morphological and biochemical characteristics of *Bacterionema*, *Odontomyces* or *Rothia*.

Practical methods for identification of Gram positive, aerobic, filamentous bacteria are discussed, as few diagnostic laboratories are aware of appropriate procedures for its isolation, cultivation or the criteria necessary for its identification.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ARAUJO, W. C. de & MACDONALD, J. B. — The gingival crevice microbiota in five preschool children. *Arch. oral Biol.*, **9**:227-228, 1964.
2. BAIRD-PARKER, A. C. & DAVIS, G. H. G. — The morphology of *Leptotrichia* species. *J. gen. Microbiol.*, **19**:446-450, 1958.
3. BARTELS, H. A. — A filamentous microorganism isolated from stained teeth. *J. dent. Res.*, **22**:97-102, 1943.
4. BIBBY, B. G. — Oral Bacteriology: Basic considerations bearing on disease and therapy. *J. Amer. dent. Ass.*, **26**:629-636, 1939.
5. BIBBY, B. G., 1935. apud GILMOUR, M. N. & BECK, P. N. — Growth and Biochemical Characteristics of *Bacterionema matruchotii*. *Bact. Rev.*, **25**:152-161, 1961.
6. BIBBY, B. G. & BERRY, G. P. — A cultural study of filamentous bacteria obtained from the human mouth. *J. Bact.*, **38**: 263-274, 1939.
7. BIBBY, B. G. & KNIGHTON, H. T. — The *Actinomyces* of the human mouth. *J. infect. Dis.*, **69**:148-154, 1941.
8. BISSET, K. A. & DAVIS, G. H. G. — *The microbial flora of the mouth*. Springfield, Illinois, Charles C. Thomas, 1960. p. 44.
9. BROWN, J. M.; GEORG, L. K. & WATERS, L. C. — Laboratory identification of *Rothia dentocariosa* and its occurrence in human clinical materials. *Appl. Microbiol.*, **17**:150-156, 1969.
10. BULLEID, A. — An experimental study of *Leptothrix buccalis*. *Guy's Hosp. Rep.*, **74**: 444-458, 1927.
11. BURNETT, G. W. & SCHERP, H. W. — *Oral Microbiology and Infectious Disease*. 3.<sup>a</sup> ed., Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1968.
12. CLARK, W. M. & LUBS, H. A. — The differentiation of bacteria of the Colon-Aerogenes family by the use indicators. *J. infect. Dis.*, **17**:160-173, 1915.
13. CROWLEY, M. C. — Isolation of an *Actinomyces*-like organism from root canals. *J. dent. Res.*, **20**:189-194, 1941.
14. DAVIS, G. H. G. & BAIRD-PARKER, A. C. — *Leptotrichia buccalis*. *Brit. dent. J.*, **106**:70-73, 1959.
15. DAVIS, G. H. G. & BAIRD-PARKER, A. C. — The classification of certain filamentous bacteria with respect to their chemical composition. *J. gen. Microbiol.*, **21**:612-621, 1959.
16. DAVIS, G. H. G. & FREER, J. H. — Studies upon an oral aerobic actinomycete. *J. gen. Microbiol.*, **23**:163-179, 1960.
17. ENNEVER, J.; ROBINSON, H. B. G. & KITCHIN, P. C. — *Actinomyces* and the dentobacterial plaque. *J. dent. Res.*, **30**:88-96, 1951.
18. FENNEL, E. A. — *Streptothrix interproximalis*, n. sp. An obligate microaerophile from the human mouth. *J. infect. Dis.*, **22**:567-575, 1918.
19. GEORG, L. K. & BROWN, J. M. — *Rothia*, gen. nov., an aerobic genus of the family *Actinomycetaceae*. *Int. J. system. Bact.*, **17**:79-88, 1967.
20. GEORG, L. K.; PINE, L. & GERENCSEER, M. A. — *Actinomyces viscosus* comb., nov. a catalase positive, facultative member of the genus *Actinomyces*. *Int. J. system. Bact.*, **19**:291-293, 1969.
21. GERENCSEER, M. A. & SLACK, J. M. — Identification of human strains of *Actinomyces viscosus*. *Appl. Microbiol.*, **18**:80-87, 1969.
22. GIBBONS, R. J.; SOCRANSKY, S. S.; SAWYER, S.; KAPSIMALIS, B. & MACDONALD, J. B. — The microbiota of gingival crevice area of man. II. The predominant cultivable organisms. *Arch. oral Biol.*, **8**: 281-289, 1963.
23. GIBBONS, R. J.; SOCRANSKY, S. S.; ARAUJO, W. C. de & VAN HOUTE, J. — Studies of the predominant cultivable microbiota of dental plaque. *Arch. oral Biol.*, **9**:365-370, 1964.

24. GIES, W. J. & KLIGLER, I. J. — Chemical studies of the relations of oral microorganisms to dental caries. III. A biochemical study and differentiation of oral bacteria with special reference to dental caries. *J. Allied D. Soc.*, **10**:282, 1915.
25. GILMOUR, M. N. & HUNTER, P. A. — Isolation of an oral filamentous microorganism. *J. Bact.*, **76**:294-300, 1958.
26. GILMOUR, M. N. & BECK, P. H. — The classification of organisms termed *Leptotrichia* (*Leptothrix*) *buccalis*. III. Growth and biochemical characteristics of *Bacterionema matruchotii*. *Bact. Rev.*, **25**:152-161, 1961.
27. GILMOUR, M. N.; HOWELL Jr., A. & BIBBY, B. C. — The classification of organisms termed *Leptotrichia* (*Leptothrix*) *buccalis*. *Bact. Rev.*, **25**:131-141, 1961.
28. GORDON, Jr., D. F. & GIBBONS, R. J. — Studies of the predominant cultivable microorganisms from the tongue. *Arch. oral Biol.*, **11**:627-632, 1966.
29. HOWELL Jr., A. — A filamentous microorganism isolated from periodontal plaque in hamsters. I. Isolation, morphology and general cultural characteristics. *Sabouraudia*, **3**:81-92, 1963.
30. HOWELL Jr., A. & ROGOSA, M. — Isolation of *Leptotrichia buccalis*. *J. Bact.*, **76**:330-331, 1958.
31. HOWELL Jr., A.; MURPHY, W. C.; PAUL, F. & STEPHAN, R. M. — Oral strains of *Actinomycetes*. *J. Bact.*, **78**:82, 1959.
32. HOWELL Jr., A. & PINE, L. — The classification of organisms termed *Leptotrichia* (*Leptothrix*) *buccalis*. IV. Physiological and biochemical characteristics of *Bacterionema matruchotii*. *Bact. Rev.*, **25**:162-171, 1961.
33. HOWELL Jr., A. & JORDAN, H. V. — A filamentous microorganism isolated from periodontal plaque in hamsters. II. Physiological and biochemical characteristics. *Sabouraudia*, **3**:93-105, 1963.
34. HOWELL Jr., A.; JORDAN, H. V.; GEORG, L. K. & PINE, L. — *Odontomyces viscosus*, gen. nov., spec. nov., a filamentous microorganism isolated from periodontal plaque in hamsters. *Sabouraudia*, **4**:65-68, 1965.
35. HOWELL Jr., A. & JORDAN, H. V. — Production of an extracellular levan by *Odontomyces viscosus*. *Arch. oral Biol.*, **12**:571-573, 1967.
36. HURST, V. — Morphologic instability of *Actinomycetes* associate with enamel. *J. dent. Res.*, **29**:571-582, 1950.
37. International Association of Microbiologists. International Committee on Bacteriological Nomenclature. International code of nomenclature of bacteria and viruses; bacteriological code. Ames, Iowa State College Press, 1958.
38. JORDAN, H. V. & KEYES, P. H. — Aerobic, Gram-positive, filamentous bacteria as etiologic agents of experimental periodontal disease in hamsters. *Arch. oral Biol.*, **9**:401-414, 1964.
39. JORDAN, H. V. & KEYES, P. H. — Continuing studies on the relationship between filamentous oral bacteria and hamster periodontal disease. *J. dent. Res.*, **43**:902, 1964.
40. KEYES, P. H. & JORDAN, H. V. — Periodontal lesion in the Syrian hamster. III. Findings related to an infectious and transmissible component. *Arch. oral Biol.*, **9**:377-400, 1964.
41. KLIGLER, I. J. — A biochemical study and differentiation of oral bacteria with special reference to dental caries. *J. Allied D. Soc.*, **10**:282-330, 1915.
42. MENDEL, J. — *Cladotrichix* et infection d'origine dentaire. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **82**:583-586, 1919.
43. MORRIS, E. O. — The bacteriology of the oral cavity. V. *Corynebacteria* and Gram-positive filamentous organisms. *Brit. dent. J.*, **97**:29-36, 1954.
44. ONISI, M. — Study on the *Actinomycetes* isolated from the deeper layers carious dentine. *Shikagaku Zasshi (Tokio)*, **6**:273-282, 1949.
45. ONISI, M. & NUCKOLLS, J. — Descriptions of actinomycetes and other pleomorphic organisms recovered from pigmented carious lesions of human teeth. *Oral Surg.*, **11**:910-930, 1958.
46. ORLAND, F. J. — The oral bacterial flora as related to dental caries in the Syrian hamster. *J. dent. Res.*, **25**:445-467, 1946.
47. RICHARDSON, R. L. & SCHIMIDT, J. — An oral filamentous microorganism: Cultural characteristics and microbiota relationships affecting growth. *J. dent. Res.*, **38**:1016-1027, 1950.
48. RITZ, H. L. — Selective medium for oral *Nocardia*. *J. dent. Res.*, **45**:411, 1966.
49. RITZ, H. L. — Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch. oral Biol.*, **12**:1561-1568, 1967.
50. ROSEBURY, T. — *Micro-organisms Indigenous to Man*. New York. McGraw-Hill, 1962. p. 77.
51. ROTH, G. D. — Proteolytic organisms of the carious lesions. *Oral Surg.*, **10**:1105-1117, 1957.
52. ROTH, G. D. & THURN, A. N. — Continued study of oral *Nocardia*. *J. dent. Res.*, **41**:1279-1292, 1962.
53. WAKSMAN, A. — *The Actinomycetes*. Baltimore. Williams & Wilkins Co, 1961. V. II, p. 60.
54. WINFORD, E. T. & HABERMAN, S. — Isolation of aerobic Gram-positive filamentous rods from diseased gingivae. *J. dent. Res.*, **45**:1159-1167, 1966.

Recebido para publicação em 27/4/1971.

