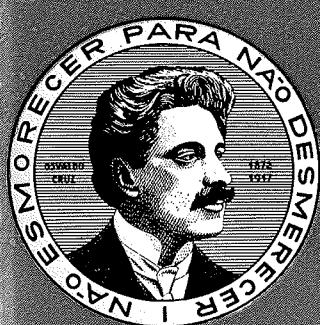


Vol. 2, n.º 4, p. 163-210

1971

REVISTA
DE
MICROBIOLOGIA



Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

Os modernos métodos de análises clínicas têm êste 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, Fosfatas 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 — 256-1632 — 256-9848 — 257-1831 — São Paulo, SP

C O N T E Ú D O

EDITORIAL

A educação para a pesquisa — I. SUASSUNA	Pág. 163
--	-------------

ARTIGOS ORIGINAIS

Studies on enteric bacterias in the lower Amazon Region: II. <i>Salmonella</i> types isolated from wild reptiles in Pará State, Brazil — Z. C. Lins	165
Sobre um novo teste "in vivo" da ação protetora de antimicrobianos em camundongos. — Tentativa preliminar de avaliação comparativa entre cloranfenicol, ampicilina e hetacilina — E. de Azevedo e Silva, F. J. G. Coutinho, I. M. de Morais & E. A. Maciel	171
Inhibition of <i>Crithidia fasciculata</i> by ethidium: Temperature and adenine effects — A. C. Manaia & I. Roitman	177
Cutaneous streptothricosis in brazilian cattle — O. Fischman, M. A. S. C. Portugal & I. G. Arantes	181
Protective effect of <i>Leptomonas pessoa</i> against the infection of mice by <i>Trypanosoma cruzi</i> — M. C. M. Souza & I. Roitman	187
On the use of von Krogh's logistic equation in the quantitative complement fixation test — J. O. de Almeida	191
Economical system for the identification of non-fermentative, Gram-negative rods: II. An updated, simplified alternative — A. von Graevenitz & S. Pantelick	199
Uma terceira espécie de <i>Actinomycetales</i> do gênero <i>Elytrosporangium</i> , <i>E. carpinense</i> sp. nov., isolada de solo em Pernambuco — J. O. Falcão de Moraes, J. O. da Silva & C. Machado	203

NOTA

Isolation of <i>Arizona</i> from human enteric infections — M. I. Siqueira & M. Magalhães	207
---	-----

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 Ç 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_{μ}) e micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em nanômetros (nm; 10^{-9} m) ou em micrômetros (μm ; 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 (μ litros/litro). A *Revista* se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

EDITORIAL

A EDUCAÇÃO PARA A PESQUISA

ÍTALO SUASSUNA⁽¹⁾

Primeiro vem o exercício instintivo e puro da curiosidade e de uma imensa vontade de entender. Comega com o olhar da criança que cada dia se abre para o mundo com a necessidade de definir e relacionar. Há uma preferência pelo jôgo, pelo brinquedo ou pela busca de associações entre estruturas e idéias, com o encontro da harmonia em face a resultados antes não entrevistos mas agora reproduzidos e entendidos. Nasce espontânea a descoberta e de sua interpretação surge o conhecimento científico.

Filósofos ou administradores, críticos ou governantes, planejadores ou educadores, nenhum teve êxito em negar o fato de que a vocação e a criação científica constituem características arraigadamente individuais, desvinculados do êxito da aceitação ou do sucesso profissional, um fenômeno de mentes isoladas que se pode expressar até mesmo como um desafio, e que pode ser somado no plano da aceitação social, mas que jamais se despessoaliza. Como atividade criadora essencial e personalista, o cientista em seu melhor conceito e sua atividade científica, só encontra paralelo com o artista e a atividade artística. De fato, muito do que se tem defendido ou definido em um ou outros desses campos, aplicar-se-ia indiscriminadamente a ambas as atividades. Muitos poderão aprender a metrificar ou fazer versos, mas poucos produzirão poesia; muitos estudarão ciências, mas poucos contribuirão para o conhecimento científico.

“Deve ser lembrado que, em última instância, a pesquisa é um empreendimento essencialmente individual, sujeitando-se a tôdas as flutuações, hesitações e até mesmo ansiedades do conhecimento, e que deve evitar a extrema regulamentação ou rigidez, se não desejados resultados felizes ou produtivos”. Por outro lado, “a ciência, compreendida propriamente como uma forma de cultura, corresponde na realidade a um meio de eventualmente ofertar à toda a comunidade, um propósito de percepção do próprio contexto humano; fornece uma visão global do universo, inspirada na própria natureza intelectual do homem; eventualmente assegura as bases para um entendimento recíproco e, em qualquer caso, constitui um terreno adequado para erguer a educação”.

Embora, essencialmente livre seja a mente criadora, o ato de criação e, consequentemente a atividades de pesquisa que a elle conduz, subordina-se a uma rígida disciplina, a qual, independentemente do processo de aprendizagem, é fundamentalmente uma auto-disciplina e uma abertura da própria consciência. Observa-se que no campo das artes, a palavra pesquisa é utilizada para descrever o período de ensaio e elaboração, enquanto não se define o produto artístico. Este sentido de auto-disciplina e a subordinação à técnica de alcançá-lo é que, de fato, para cada um, vem a definir o êxito eventual, seja quanto ao que se considere o Belo ou quanto ao que se chame a Verdade. Se o êxito é assim encarado, não há líderes ou liderados, não há verdades maiores ou me-

(1) Professor Adjunto de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Microbiologia da U. F. R. J. e Professor Catedrático de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da U.E.G., Rio de Janeiro, Brasil

nóres, não há técnicas mais perfeitas, porque não pode haver técnicas imperfeitas, não há ciência maior, porque não poderia haver ciências menores que prescindissem dos mesmos princípios, e, finalmente, não há a Ciência pura e isolada, em detrimento de ciências aplicadas, porque qualquer ciência pressupõe atingir a mesma Verdade, no conceito de seu valor humano.

Como a informação é a tarefa inicial para treinar e disciplinar a mente, um desenvolvimento desarmônico com o exagero dessa etapa, tende a produzir o erudito, de quem já se disse; homens capazes de repetir o que já se sabe, todavia incapazes de criar. No campo científico, êstes promovem ou criticam resultados, mas ignoram por completo, ou pior ainda, estimulam de modo negativo a lógica ou a logística de sua aquisição.

Outros, encantam-se com a técnica e a execução e tornam-se mecanólatras ou ritualistas, reproduzindo estérilmente os mesmos processos ou métodos que outros produziram ou descreveram. Se, na infância fomos buscar as raízes puras do sentido de descoberta, são êstes os que se apoiam em uma forma esteriotipada da mesma sublimação do sentido lúdico infantil, em que embrionariamente repousa a atividade criadora.

Em relação a tais enganos, enquanto os primeiros repetem e repetem, os segundos confirmam e confirmam. Ambos desorientam ou deseducam para a atividade criadora. Equívocas ou equivocadas, essas figuras nada têm de engraçadas ou jocosas. São sobretudo perniciosas ou enganadoras em países como o nosso, que não só almejam, mas necessitam, como fruto mesmo da estratégia de seu desenvolvimento, sobreviver ou aparecer entre as nações poderosas, através de um rápido, robusto e realístico processo de desenvolvimento científico.

É fácil deduzir que os cientistas não são criados, mas selecionados, e que a sua educação repousa na atitude de estimular a procura em torno de seu próprio mundo, no exercício livre de sua curiosidade em relação a problemas para os quais a sua mente auto-disciplinada, no limite de seu nível de preparo, buscará as soluções.

No confronto dos problemas oferecidos pela realidade brasileira, é possível que as artes nos indiquem um caminho que deva ser considerado para o nosso desenvolvimento científico. No mundo de hoje, já tacitamente conceituado como um povo de artistas, da prosa à canção, da pintura à arquitetura e do carnaval ao futebol, tôdas essas atividades que nos personalizam como nação, só quando alicerçadas ou inspiradas pela própria realidade brasileira lograrão a mensagem humana e internacional que pretendiam. Que a nossa ciência cultive essa atitude, responda ao que em torno de nós desafia a nossa capacidade, evite a moda ocasional ditada pelos interesses de outros povos, e realize assim uma contribuição brasileira, que possa ser somada e não confundida, destacada e não ignorada, no edifício uno da Ciência que é comum a todos os povos.

Recebido para publicação em 18/10/1971.

STUDIES ON ENTERIC BACTERIAS IN THE LOWER AMAZON REGION:
II. *SALMONELLA* TYPES ISOLATED FROM WILD REPTILES IN PARÁ
STATE, BRAZIL

Z. C. LINS⁽¹⁾

S U M M A R Y

A study was made of the occurrence of *Salmonella* types in wild lizards and snakes trapped on a newly opened plateau of the Carajás Mountains, Pará State, North Brazil.

S. javiana was recovered from the intestine of 1 of 2 specimens of the iguanid lizard *Uranoscodon superciliosus* and from 1 of 5 snakes (*Leimadophis almadensis*, Colubridae).

S. oranienburg, *S. soestberg* and a new type Sub-Genus IV-43:z₂₉: —, were obtained as single isolations from 3 separate specimens out of 16 iguanid lizards, *Tropidurus torquatus*. *S. marina* was isolated from 2 further specimens of *T. torquatus*.

A double infection by *S. oranienburg* and *S. marina* was found in 1 of 2 teiid lizards, *Ameiva a. ameiva*.

The view is expressed that reptiles might represent primitive natural hosts of many well known *Salmonella* types, which live as commensals or symbionts in these cold-blooded hosts. These bacteria may cause disease when transferred to man or other unaccustomed hosts.

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

In a previous paper in this series⁵ the author discussed the occurrence of *Salmonella* in wild animals. It was stressed that few recorded isolations can be considered to be from *truly* wild animals. In contrast, the isolation of numerous strains of *Salmonella* from rodents, marsupials and lizards from uninhabited forest in the Lower Amazon Region of Brazil was reported. It was concluded that this did indeed offer evidence of an extensive reservoir of infection in genuinely wild animals, and that these must be regarded as potential sources of infection for man or his livestock when such uninhabited areas are explored and colonized.

The present paper discusses the isolation of further *Salmonella* types from lizards and snakes in a distinctly different ecological area within the same lower Amazon Region, providing additional information on the most common serotypes present in the Region.

MATERIALS AND METHODS

It is a popular misconception that the Lower Amazon Valley is occupied entirely by dense, low-lying, tropical rain forest. This is not so. In extensive areas there are "mountain" ranges which rise to some 700 or more metres above the forest canopy. For much time shrouded in mist, these plateaus have steep, densely forested slopes (Figure 1) which make their summits accessible only with great difficulty on foot. Only recently has this prolonged isolation from civilized man been broken, by the use of the helicopter. Following the discovery of rich iron deposits in the mountain range "Serra dos Carajás" in August, 1967, for example, a small camp of mineralogists was established on a plateau on the Northern wing of the mountains (lat. 5° 54' — 6° 33' S. and long. 49° 35' — 50° 34' W.), between the two major Southern tributaries

(1) Seção de Bacteriologia, Instituto Evandro Chagas, Belém, Pará, Brasil

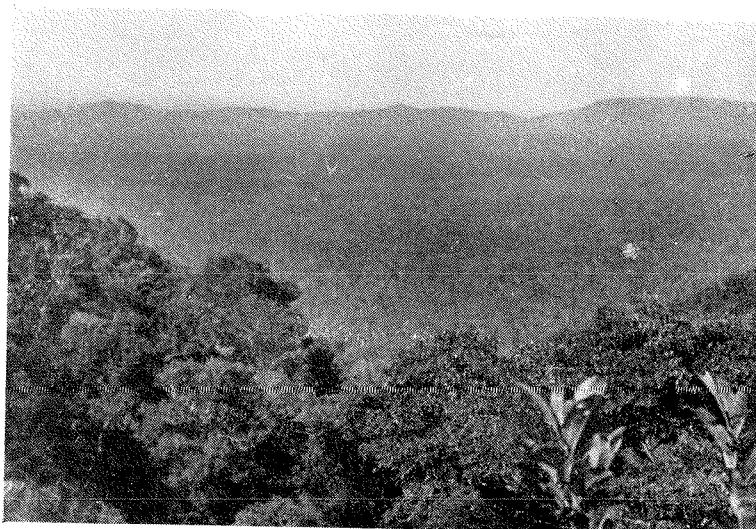


Fig. 1 — View of densely forested slopes in the mountain range, Serra dos Carajás, looking from the plateau study area

of the Amazon, the Xingú and the Tocantins rivers. The area is approximately 150 kilometres (92 miles) from the town of Marabá in Pará State and 550 km (343 miles) from the capital, Belém. Shortly afterwards, members of this Institute were flown into the camp area to assess and advise on health problems there; the opportunity was taken to collect lizards and snakes for the following study.

The upper part of the plateau presented a rather bleak, rocky terrain (Figure 2). The soil is for most part very thin, and

constantly leached by rain and baked by the sun. Large areas are pure rock, very rich in iron and permitting a minimum of shrubby, xerophytic vegetation. There are isolated patches of stunted trees which manage to survive in pockets of poor soil. The extremely uneven nature of the plateau results in the accumulation of bodies of water of variable size, ranging from small lakes to swampy, grassy areas with a few shrubby trees. While poor in mammalian fauna, the tops of these plateaus support a variety of reptiles and birds. Regarding previous human habitation, the sole finding of the



Fig. 2 — Aspect at top of plateau, showing contrasting scanty vegetation and rocky terrain of study area where infected lizards were trapped

visiting prospectors was an antique arrangement of stones in a dried lake bed. This was presumed to have been made by Indians but, if responsible, they left no sign of dwelling places or other activities and must have passed on a great many years previously.

Lizards were caught using a running noose of fine nylon fishing line attached to a thin stick. *Tropidurus torquatus*, the most abundant lizard in the area, is particularly easy to trap in this way as it likes to bask in the sun on exposed rocks. The different reptiles were maintained in clean polythene bags and examined as soon as possible on return to the laboratory in Belém.

The spleen and a portion of liver were removed from each animal and triturated together with sterile white sand in a sterile pestil and morter. Portions of small and large intestine were then placed in separate petri-dishes and slit open to obtain the contents. Extreme care was taken to use different sterile instruments for each source of material.

The triturated viscera and intestinal contents of small and large intestine were plated out separately on SS agar, EMB agar and bismuth sulphite agar (Difco), and enriched in Kauffman's combined enrichment medium^{2, 3}. After incubation at 37°C for 24 hours, subcultures from the enrichment medium were made onto bismuth sulphite agar. Subsequent procedure has already been described⁴. Serotypes were kindly determined by Dr. Joan Taylor, *Salmonella* Reference Laboratory, Colindale, London.

RESULTS

Nine strains of *Salmonella*, comprising 6 different serotypes, were isolated from the 29 reptiles examined, as follows.

In snakes:

Family Colubridae: *S. javiana* from one of 5 *Leimadophis almadensis* examined.

In lizards:

Family Iguanidae: *S. javiana* from one of 2 *Uranoscodon superciliosa*; *S. oranienburg*, *S. soestberg* and a new type of *Salmonella* subgenus IV (43:z₂₉: —) were recovered as single isolations from 3 separate specimens out of 16 *Tropidurus torquatus* examined. *S. marina* was recovered from 2 specimens of *T. torquatus*.

Family Teiidae: A double infection by *S. oranienburg* and *S. madelia* was found in one of 2 *Ameiva ameiva ameiva* examined.

From the large intestine only, isolations resulted on 5 occasions (two strains of *S. oranienburg*, one *S. soestberg*, one *S. javiana* and one of *S. marina*); from the small intestine only on one occasion (*S. madelia*); and from both large and small intestine of the same animal on 3 occasions (*S. marina*, *S. javiana* and the new type of *Salmonella* subgenus IV-43:z₂₉: —).

No isolations were made from spleen and liver.

DISCUSSION

Within the genus *Salmonella*, *S. typhi* is generally regarded as being completely host specific to man, in nature. Other species, while found much more frequently in certain animal hosts, can become adapted to others, including man. This is of epidemiological importance, for the presence of a particular type of *Salmonella* in an unusual host may usually be taken to indicate close contact of that animal with the normal host, or with an environment contaminated by it.

The remarkable frequency of *Salmonella* in reptiles has been emphasised in many studies, but the significance of these infections is still far from clear and different workers' findings are often conflicting. Thus, in Tanganyika, MACKEY⁶ obtained a high infection-rate in droppings of house-lizards *Hemidactylus mabuya* and *Mabuia striata* (both Geckonidae) and concluded that salmonellae were a part of the normal gut flora of such lizards. COLLARD & MONTEFIORE¹, however, failed to isolate *Salmonella* from the gut contents of 100 specimens of a closely related house-gecko, *H. brookii*, in Ibadan, Nigeria, but obtained isolations from 18 out of 160 *Agama agama* (Agamidae). These authors felt that *Salmonella* infections were not part of the normal gut flora of lizards but were simply related to their environment and contaminated food. They account for the high rate of infection in agamids, compared with no infections in the house-geckoes, by the fact that the former lizards have a much more omnivorous diet, including waste scraps of food, whereas the geckoes are almost entirely insectivorous.

It is true that the observations of MACKEY⁶, and COLLARD & MONTEFIORE¹, are in both instances complicated by the

close association of the lizards with humans and domestic animals, and that in these cases their infections may have been purely accidental, following the ingestion of contaminated food. I am unable to agree that this always follows, however, for in a previous paper⁵ a high incidence of *Salmonella* infection was found in teiid lizards (*Ameiva ameiva ameiva*) living in completely uninhabited regions in Brazil.

In the present study the possibility cannot be entirely excluded that some of the reptiles might have derived their *Salmonella* infections from human excrement. I think, however, that this is most unlikely, in view of the good conditions of hygiene existing in the encampment and the small number of personnel working there. Latrines were deeply dug and well covered against flies, while the ferruginous nature of the soil allowed little, if any, seepage. Finally, two of the infected lizards (*Ameiva a. ameiva* and *Uranoscodon superciliosa*) were taken some miles from the encampment, in an area unlikely to have been frequented by any of the camp personnel; and the rest were captured at a distance of up to half a mile along the track leading out from the camp. The single infected snake was caught at the edge of a small rivulet, some 1/2 mile up-stream from the camp, and was unlikely to have become contaminated from that source.

From this and previous studies I believe that a wide range of reptilians harbour salmonellae as a natural part of their gut flora, and that some of these organisms are commonly associated with pathological conditions in man and domestic animals. In their attempts to explain the lack of infection in the gecko as compared with the agamids, COLLARD & MONTEFIORE¹ suggested that "there may be some aspect of bowel environment in the gecko, which renders it unfavorable for *Salmonella* organisms". In this respect it might be mentioned here that an examination of 11 house geckos (*Hemidactylus mobuya*) and one forest gecko (*Gonatodes humeralis*) in my laboratory have similarly yielded no positive cultures.

Taylor⁷ stressed that species of *Salmonella* most commonly isolated from reptiles have been those of the subgenera II and III (simplified Kauffmann-White scheme). In previous studies^{4, 5} and in the present work, however, I have been able to isolate only types of subgenera I and IV from 148 lizards and 9 snakes studied. To my knowledge *Salmonella* of subgenus II appear not yet to have

been described in Brazil and seem to be predominantly found in Africa.

In sharp contrast with the predominance of subgenus I and IV from lizards and snakes examined here, a great many strains which appear to be biochemically related to subgenus III (*S. arizona*) have recently been isolated from specimens of the tortoise *Kinosternon scorpioides* from Marajo Island, Northern Brazil. Serological identification of these strains is in progress and will form the subject of a further communication.

It is most interesting that the *Salmonella* types isolated from lizards in the higher, mountainous region of the Carajás in this study are completely different from those I encountered in the lizards from the lower, tropical rain forest⁵. This might be considered due simply to different host preferences (the predominant lizards in the two areas were *Tropidurus torquatus* and *Ameiva ameiva ameiva* respectively). It might, however, be a reflection of variation among reptiles, in general, that live in widely different ecological habitats.

Finally, it was notable that on no occasion was any sickness or any gross intestinal pathology found in the infected reptiles in this and the previous work. Some of the strains isolated, however, are known to give rise to diarrhoea or other pathological symptoms in man and other warm-blooded animals. In view of this it is tempting to postulate that reptiles might represent primitive natural hosts of such bacteria. In these cold-blooded hosts they are probably mere commensal or symbiotic inhabitants of the intestinal tract.

RESUMO

Estudos sobre bactérias entéricas na baixa região amazônica. II — Tipos de Salmonella isolados de répteis selvagens do Estado do Pará, Brasil

Investigações foram feitas quanto aos tipos de *Salmonella* ocorrentes em lagartos e cobras capturados nos plateaus recentemente explorados da Serra dos Carajás, Estado do Pará, Norte do Brasil.

Salmonella javiana foi registrada em um de dois espécimes de iguanídeos — *Uranoscodon superciliosa* e em uma entre cinco cobras (*Leimadophis almadensis*, Colubridae).

S. oranienburg, *S. soestberg* e um novo tipo de *Salmonella* sub-gênero IV com fór-

mula antigênica 43:z₂₉: — foram isoladas de 16 exemplares de *Tropidurus torquatus*, e *S. marina* de mais dois outros espécimes do iguanideo em questão.

Infecção dupla por *S. oranienburg* e *S. madelia* foi encontrada em um entre dois teídeos do gênero *Ameiva a. ameiva*.

A presença de salmonela em répteis é discutida, sugerindo-se serem êsses animais hospedeiros primitivos naturais de muitos dos tipos de *Salmonella* comumente conhecidos, que viveriam em comensalismo ou simbiose nos animais de sangue frio, podendo vir a causar doença quando transmitidos ao homem ou outro hospedeiro casual.

A C K N O W L E D G E M E N T S

This work was financed largely with funds provided by the Wellcome Trust, London, England.

I am much indebted to Dr. R. Lainson, Director, the Wellcome Parasitology Unit, Instituto Evandro Chagas, for provision of the reptiles, and for his helpful criticism during the preparation of this paper. Also, to Dr. Joan Taylor, the *Salmonella* Reference Laboratory, Colindale, England, for the serological identification of the strains isolated.

R E F E R E N C E S

1. COLLARD, P. & MONTEFIORE, D. — *Agama agama* as a reservoir of infection in Ibadan. *W. Afr. med. J.*, 5:154-156, 1956.
2. EDWARDS, P. R. & EWING, W. H. — "Identification of Enterobacteriaceae", 6th Ed, Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1968.
3. KAUFFMANN, F. — "The Bacteriology of Enterobacteriaceae", Munksgaard, Copenhagen, 1966.
4. LINS, Z. C. — Ocorrência do gênero *Salmonella* em animais silvestres capturados na Floresta Amazônica. *An. Microbiol.*, 12:19-29, 1964.
5. LINS, Z. C. — Studies on enteric bacteria in the lower Amazon Region: I. Serotypes of *Salmonella* isolated from wild forest animals in Pará State, Brazil. *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, 64:439-443, 1970.
6. MACKEY, J. P. — Salmonellosis in Dar-es-Salaam. *E. Afr. med. J.*, 32:1-6, 1955.
7. TAYLOR, J. — Salmonella in wild animals. *Symp. Zool. Soc. London*, 24:51-73, 1968.

Recebido para publicação em 8/12/1971.

SÔBRE UM NOVO TESTE "IN VIVO" DA AÇÃO PROTETORA DE ANTIMICROBIANOS EM CAMUNDONGOS. — TENTATIVA PRELIMINAR DE AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE CLORANFENICOL, AMPICILINA E HETACILINA

Evans de Azevedo e SILVA⁽¹⁾, Francisco José Godim COUTINHO⁽²⁾, Ivanilde Maciel de MORAIS⁽³⁾ & Eldenize Amorim MACIEL⁽³⁾

R E S U M O

São apresentados os resultados de uma comparação de atividade protetora de três antimicrobianos, quais sejam: cloranfenicol (bacteriostático), ampicilina e hetacilina (bactericidas) em um modelo experimental proposto para complementar a metodologia clássica de avaliação "in-vivo" de antimicrobianos frente a infecções experimentais. O modelo experimental proposto é o da mortalidade tóxica e por infecções secundárias, consequentes a uma dose única do citostático e imunossupressor ciclofosfamida, capaz de matar 80 a 100% dos camundongos no prazo de 30 dias, sem qualquer infecção padronizada concomitante por germes previamente determinados.

Ficou demonstrado, inclusive por análise estatística, que os três antimicrobianos usados protegeram os animais tratados de modo altamente significativo; constatou-se, por outro lado, que os animais que receberam ampicilina e hetacilina perderam durante os 45 dias iniciais mais peso corporal que os tratados com o cloranfenicol.

I N T R O D U Ç Ã O

Desde 1935 com Domagk e o "Prontosil"^{4,5} e subsequentemente à aplicação prática da penicilina, tem-se processado um intenso e ininterrupto acréscimo de antimicrobianos no arsenal terapêutico das doenças infecciosas, sem um correspondente aumento na flexibilidade das técnicas de avaliação experimental "in-vivo" dessas substâncias.

No presente trabalho, procuramos apresentar uma metodologia que faculte a obtenção de novos dados relacionados com a proteção antimicrobiana "in-vivo", frente a um modelo biológico-experimental em que:

- a) a entidade ou entidades microbianas que venham a causar a morte dos

animais não sejam conhecidas a priori, nem obrigatoriamente idênticas nos diferentes animais componentes das amostragens dos grupos reação e testemunha;

- b) o agente ou agentes microbianos letais não sejam administrados artificialmente em doses centenas ou milhares de vezes letais;
- c) seja possível uma depressão dos sistemas imunitários;
- d) haja anorexia e perda de peso corporal concomitantemente;
- e) se possa ter simultaneamente a avaliação de toxidez crônica frente a condições tóxicas e padronizadas;

(1) Universidade Federal de Pernambuco, Instituto de Biociências, Departamento de Patologia e Biologia Gerais, Laboratório de Patologia Experimental (Professor Titular)

(2) Universidade Federal de Pernambuco, Escola de Química (Professor Titular, na época à disposição do Instituto de Biociências)

(3) Auxiliares de Ensino da Disciplina de Patologia Experimental, Instituto de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

- f) se façam testes de avaliação comparativa de diferentes antimicrobianos em condições experimentais adversas e que simulam, até certo grau, as de paciente humanos com infecções graves em pleno curso, estado geral prejudicado, sistemas defensivos deprimidos, intoxicados e portadores de outros parâmetros não simulados nos modelos experimentais convencionais já existentes.

O presente trabalho não trata de apresentar um método que venha substituir os já tradicionais e sim uma metodologia adicional que em tentativa preliminar procura avaliar comparativamente e em nível de dosagem único, as eficácia protetoras antimicrobianas de um agente bactericostático amplo (Cloranfenicol) e duas penicilinas semi-sintéticas bactericidas (ampicilina e hetacilina) sobre a letalidade em camundongos, originada da ação tóxica e depressora da ciclofosfamida (agente carcinostático e imunossupressor).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados camundongos albinos machos pertencentes à nossa colônia, mantidos através de procedimentos apropriados em alto heterozigotismo e com pesos individuais entre 25 e 30 gramas. Os animais em grupos de 20 cada e no total de 100 camundongos foram distribuídos ao acaso pelos diferentes grupos, em gaiolas individuais e observados 25 dias antes do início do experimento, em sala climatizada a 25°C, recebendo água e ração prensada padronizada "ad libitum", sendo pesados diariamente.

Como agente leucopênico e imunossupressor, visando à obtenção de mortalidade significativa (90 a 100% no grupo testemunha) e toxidez simultânea ou retardada, foi utilizada a preparação comercial de ciclofosfamida (*N,N*-bis(beta-cloretil)-diamida do éster *N'*, O-propilen-ortofosfórico), de ampla utilização clínica na quimioterapia das neoplasias^{1, 6, 8, 10, 11}. Foi empregado por via intraperitoneal e na dose única de 300 mg/kg de peso corporal (DL50 de acordo com LANE⁷), na concentração de 30 mg/ml em soro fisiológico e dose volumétrica individual de 10 ml/kg de peso corporal em 80 camundongos, posteriormente divididos nos grupos B, C, D e E. Os 20 animais restantes que não receberam ciclofosfamida (grupo A), permaneceram como controle, para averiguação de uma possível influência do manuseio e traumatismos bídíários durante 43 dias através de injeções subcutâneas de soro fisiológico em dosagem volumétrica idêntica. Os camundongos do grupo B (testemunha) também receberam 48 h após a injeção intraperitoneal de ciclofosfamida, injeções subcutâneas bi-diárias de soro fisiológico na mesma dose volumétrica referida, durante 43 dias consecutivos. (Tabela I).

T A B E L A I

Percentuais de mortalidade a sucessivos e progressivos intervalos de 5 dias, até 45 dias e leitura final aos 90 dias. (Detalhes no texto)

Grupos	N.º de camundongos	Mortalidade a sucessivos e progressivos intervalos de 5 dias até 45 e 90 dias									
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	90
A (Controle)	20	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
B (Testemunha)	20	0%	20%	50%	75%	90%	90%	100%	100%	100%	100%
C (Reação-cloranfenicol)	20	5%	30%	50%	55%	55%	55%	60%	60%	60%	70%
D (Reação-ampicilina)	20	5%	20%	20%	35%	45%	50%	50%	55%	55%	60%
E (Reação-hetacilina)	20	15%	35%	40%	45%	45%	45%	45%	50%	50%	70%

T A B E L A III

Valores de "qui-quadrado" e P (Possibilidade de que os resultados hajam sido aleatórios) nos confrontos estatísticos dos grupos B1/B; C/B; D/B e E/B, entre os 20 e 45 dias após o início do experimento e apenas no 30.^o dia no confronto B1/B. Também são tabulados os resultados dos confrontos C/B; D/B e E/B no 90.^o dia e neste caso com relação às mortalidades apresentadas por esses grupos no 45.^o dia.

Grupos (+)	"qui-quadrados" e valores P (significância estatística) a diferentes intervalos de 5 dias.					90 (+++)
	20	25	30	35	40	
B1/B (++)	—	—	10,00 (MS) P < 0,005	—	—	—
B/C	1,74 (NS) P < 0,1	6,19 (S) P < 0,025	6,19 (S) P < 0,025	10,00 (MS) P < 0,005	10,00 (MS) P < 0,005	10,00 (MS) P < 0,005
B/D	6,22 (S) P < 0,025	9,28 (MS) P < 0,005	7,60 (S) P < 0,010	13,20 (AS) P < 0,0005	11,79 (MS) P < 0,001	11,79 (MS) P < 0,001
B/E	3,34 (NS) P < 0,10	9,28 (MS) P < 0,005	9,28 (MS) P < 0,005	16,00 (AS) P < 0,0005	13,20 (AS) P < 0,0005	13,20 (AS) P < 0,0005
C/D	1,60 (NS) P < 0,70	0,40 (NS) P < 0,60	0,08 (NS) P < 0,80	0,40 (NS) P < 0,60	—	—
C/E	0,40 (NS) P < 0,60	0,60 (NS) P < 0,40	0,40 (NS) P < 0,60	0,87 (NS) P < 0,40	—	—
D/E	0,41 (NS) P < 0,60	—	0,08 (NS) P < 0,80	0,08 (NS) P < 0,80	—	—

(+) ver especificação da letra designativa de cada grupo confrontado, na Tabela I e no texto

(++) B1 (somacão das amostragens dos grupos C, D e E ao 30.^o dia)

(+++) valores de qui-quadrado e siglas de "significância" entre o 45.^o e o 90.^o dia

NS — "não significativo"; S — "significativo"; MS — "muito significativo"; AS — "altamente significativo"

Como antimicrobianos foram testados comparativamente preparações comerciais de: cloranfenicol ($D(-)$ -treo-2-dicloro-acetamida-1-p-nitrofenil-1, 3, propanodiol) sob a forma de sal sódico do éster succínico no grupo C³; ampicilina (ácido 6($D(-)$)-alfa-aminofenilacetamido) penicilânico) sob a forma de sal sódico no grupo D⁹ e hetacilina (ácido 6(2, 2 dimetil-5-oxo-4-fenil-1-imidazolidinil)penicilânico)², sob a forma de sal potássico no grupo E. Os antimicrobianos foram administrados em doses de 500 mg/kg de peso corporal, bi-diariamente e a intervalos alternados de 10 e 14 horas durante 43 dias, por via subcutânea e em doses volumétricas de 10 ml/kg de peso corporal, iniciadas 48 horas após a injeção da dose única inicial de ciclofosfamida.

Todos os animais tiveram suas mortes e variações diárias de peso corporal anotadas e posteriormente tabuladas de 5 em 5 dias durante 45 dias, estendendo-se as observações por um período global de 90 dias. Os percentuais de morte dos grupos a cada 5 dias e durante 45 dias, a partir do dia ini-

cial, encontram-se na Tabela I. Na Tabela II estão expressas as observações concernentes à validade da utilização dos três antimicrobianos, consubstanciadas através de testes estatísticos de "qui-quadrado" e seus níveis de significância (valor P), bem como a comparação da eficácia dos três antimicrobianos e dados concernentes ao período mínimo de tempo necessário à constatação da metodologia aqui apresentada.

Foi procedida igualmente uma análise percentual e determinada a possibilidade aleatória (valor P) através do teste analítico-estatístico t de STUDENT, das modificações médias de peso dos sobreviventes de cada grupo ao fim de 45 dias com relação às médias de peso que apresentavam no dia inicial, somente utilizando-se para os cálculos os pesos dos animais sobreviventes. Testes t de STUDENT semelhantes, visando à determinação da significância estatística entre as perdas de peso apresentadas pelos grupos C, D e E também foram realizados e encontram-se juntamente com os anteriormente referidos na Tabela III.

T A B E L A I I I

Teste estatístico t de STUDENT da diferença da média de peso corporal dos camundongos sobreviventes dos diferentes grupos que receberam antimicrobianos diversos entre o 3.^o e 45.^o dias, bem como das médias das diferenças de peso corporal de cada grupo após 45 dias, comparadas entre si, somente considerando-se para efeito dos cálculos, os camundongos sobreviventes, ao 45.^o dia.

Grupos (+) E confrontos entre grupos	Média de peso em gramas ao 1. ^o dia	Média de peso em gramas ao 45. ^o dia	Perda de peso corporal em %	t de STUDENT (++)	Dif. absoluta em gramas nos 45 dias	t de STUDENT (+++)
C	25,03	22,94	8,3	1,69 (NS) P < 0,20	—	—
D	26,90	21,53	20,0	4,57 (AS) P < 0,001	—	—
E	27,99	22,27	20,5	4,58 (AS) P < 0,001	—	—
C/D	—	—	—	—	3,26	3,04 (MS) P < 0,01
C/E	—	—	—	—	3,63	2,81 (S) P < 0,02

(+) ver letras designativas de cada grupo e dos confrontos entre os mesmos na Tabela I e no texto

(++) teste t de STUDENT dentro dos mesmos grupos, utilizando-se apenas os sobreviventes ao 45.^o dia

(+++) teste t de STUDENT entre os diferentes grupos, utilizando-se apenas os sobreviventes ao 45.^o dia

NS — "não significativo"; S — "significativo"; MS — "muito significativo"; AS — "altamente significativo"

R E S U L T A D O S

Do exame da Tabela I ressaltam os seguintes fatos:

- a) a mortalidade do grupo B (testemunha) que não recebeu medicação antimicrobiana profilática alcançou o valor de 100% já aos 35 dias, sendo precedida de percentuais de mortalidade de 20%, 50%, 75% e 90% aos 10, 20 e 25 dias, respectivamente. Tais resultados se apresentam muito significativos com relação ao grupo A (contrôle) desde os 25 e 30 dias.
- b) as mortalidades aos 45 dias dos grupos C, D e E foram respectivamente 60%, 55% e 50%, tendo sofrido poucas alterações a partir do 30.^º dia, quando alcançavam valôres de respectivamente 55%, 50% e 45%. Tais resultados comparados com a mortalidade do grupo B (testemunha) forneceram para os confrontos estatísticos B/C, B/D e B/E os valôres de "qui-quadrado" respectivos de 10,00; 11,79 e 13,20 (ver Tabela II) que indicam grande significância e probabilidade que os resultados alcançados não hajam sido fruto de casualidade e sim devidos à ação protetora de cada um dos três antimicrobianos testados no presente modelo experimental. Estendendo-se a observação por um período de 45 dias sem cobertura antimicrobiana, observa-se pela Tabela I, que com relação à mortalidade de 100% apresentada pelo grupo B desde o 35.^º dia e ainda na fase de cobertura antimicrobiana, as mortalidades dos grupos C, D e E alcançaram valôres máximos respectivos de 70%, 60% e 70%. Tais acréscimos nas taxas de mortalidade não se mostraram significativos quando analisados pelo teste de "qui-quadrado" com relação às mortalidades desses mesmos grupos nos primeiros 45 dias, de acordo com a Tabela II.

D I S C U S S Ã O

A análise estatística dos resultados apresentados pelos três grupos que receberam antimicrobianos não revelou a êste nível de dosagem (500 mg/kg de peso corporal), qualquer superioridade de qualquer dos três antimicrobianos (ver Tabela II). Tal fato é aparentemente surpreendente posto que

pelo menos os derivados semi-sintéticos da penicilina (ampicilina e hetacilina) devido a suas ações bactericidas deveriam se mostrar superiores ao cloranfenicol que é meramente bacteriostático.

Os fatos expostos na Tabelas I e II e posteriormente discutidos parecem indicar de maneira concludente que nas doses utilizadas, cloranfenicol, ampicilina e hetacilina protegeram de maneira estatisticamente significativa, camundongos com seus sistemas defensivos deprimidos e intoxicação e subnutrição concomitantes, nêste modelo biológico-experimental proposto para ser utilizado também como teste comparativo entre antimicrobianos, em condições múltiplamente adversas. Por outro lado, os dados obtidos permitem supor que o presente teste de avaliação "in-vivo" deve durar um mínimo de 30 dias.

Cumpre ressaltar que a metodologia proposta no presente trabalho parece ser suficientemente adequada para uma extração visando ao paciente humano, desde que apresenta maior número de parâmetros similares com o mesmo além de se prestar simultaneamente a uma avaliação de toxicidade crônica e eficácia profilática em condições desfavoráveis. Faculta também uma metodologia suplementar para avaliação comparativa de antimicrobianos a diferentes níveis de dosagem em pacientes tratados com agentes carcinostáticos, imunossupressores e radiações ionizantes, possibilitando a administração de maiores doses desses agentes ou a manutenção das doses usuais com consequente diminuição dos riscos infecciosos secundários para os pacientes.

Um achado adicional interessante foi o de que os camundongos tratados com cloranfenicol apresentaram menor perda de peso corporal do que os animais tratados com as duas penicilinas semi-sintéticas de largo espectro (ampicilina e hetacilina), conforme encontra-se demonstrado na Tabela III, através do teste t de STUDENT e determinação do valor P (probabilidade de que o resultado haja sido aleatório).

S U M M A R Y

On a new "in-vivo" evaluation test of the protecting action of antimicrobial agents in mice; — A preliminary attempt towards the comparative evaluation of chloramphenicol, ampicillin and hetacillin

The first results of a comparison of the protecting activity of three antimicrobial

agents are presented — chloramphenicol (bacteriostatic), ampicillin and hetacillin (bactericide), with a nonclassical "in-vivo" evaluation methodology of antimicrobial agents facing experimental infections. The experimental model here advanced is the toxic and secondary infection mortality model, where the toxicity and secondary infection components follow a single dose of the cytostatic and immunosuppressor cyclophosphamide, capable itself of killing from 90% to 100% of all the mice within 30 days, without any concurrent standard infection by previously determined germs.

In this work it has been shown through the proper statistical analysis (chi-square-test) that any of the antimicrobial agents mentioned has protected in a highly significative manner the animals.

It has also been shown and verified by the t STUDENT test, with subsequent determination of the probability of the event having been a random one (P value), that the animals receiving ampicillin and hetacillin showed a tendency to lose more weight, in the first 45 days of the experiment than the animals receiving chloramphenicol.

REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARNOLD, H. & BORSEUX, F. — Synthese und abbau citostatisch wirksamer cyclischer N-Phosphamidester des Bis — (Beta-chlorathy) — amins. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **70**:539-544, 1958.
2. BUNN, P. A.; MILICICH, S. & LUNN, J. S. — Pharmacological properties of hetacillin in the human. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **5**:947-950, 1966.
3. CERIOTTI, G.; DEFRENCECHI, A.; de CARNERI, I. & ZAMBONI, V. — Experimental researches on a water soluble derivative of chloramphenicol succinate. *Atti Cong. Int. Microbiol. (Roma)*, **1**:494-497, 1953.
4. DOMAGK, G. — Ein Beitrag zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *Dtsch. med. Wschr.*, **61**:250-253, 1935.
5. DOMAGK, G. — Eine neue klasse von disinfectantsmitteln. *Dtsch. med. Wschr.*, **61**:829-832, 1935.
6. KARNOFSKY, D. A. — Late effects of immunosuppressive drugs. *Fed. Proc.*, **26**:925-932, 1967.
7. LANE, M. — Some effects of cyclophosphamide (Cytoxan) on normal mice and mice with L 1210 Leukemia. *J. nat. Cancer Inst.*, **23(6)**:1347-1357, 1959.
8. LANE, M. — The effectiveness of cyclophosphamide (Cytoxan) against well established transplanted rodent tumors. *Cancer Res.*, **20(8)**:1269-1273, 1960.
9. NAUMANN, P. — Ampicilina. Ácido 6(D—)-alfa-amino-fenilacetamido) penicilânico. Ac-tividade antibacteriana y concentraciones del preparado in vivo. *Arzneimittel-Forsch.*, **12**:984-992, 1962.
10. OCHOA Jr., M. — Alkylating agents in clinical cancer chemotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **163**:921-930, 1969.
11. YAMAKI, H.; TANAKA, N. & UMESAWA, H. — Effects of several tumor-inhibitory antibiotics on immunological responses. *Journal of Antibiotics. Ser. B.*, **22(7)**:315-321, 1969.

Recebido para publicação em 8/12/1971.

INHIBITION OF *CRITHIDIA FASCICULATA* BY ETHIDIUM: TEMPERATURE AND ADENINE EFFECTS

Armando da Costa MANAIA⁽¹⁾ & Isaac ROITMAN⁽²⁾

S U M M A R Y

Inhibition of growth of *Crithidia fasciculata* by ethidium bromide was studied in a defined medium. It was shown that the drug inhibited growth and that the inhibition was more effective at 32°C than 28°C. Amongst several compounds tested, it was shown that adenine neutralized the action of ethidium bromide.

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

Ethidium bromide has often been used in the treatment of cattle trypanosomiasis^{3, 13}. Newton⁷, showed the inhibitory effect of ethidium on growth of *Crithidia oncopelti*. In small concentrations the drug seems to bind preferentially to the kinetoplast DNA^{1, 9-11}. In high concentrations ethidium binds to both kinetoplast and nuclear DNA². Like acriflavine, ethidium seems to intercalate in DNA molecules¹⁴. In the present paper the effect of temperature and compounds neutralizing the treatment of cattle trypanosomiasis^{3, 13}, of *Crithidia fasciculata* in a defined medium, was studied.

MATERIALS AND METHODS

Strain used: *Crithidia fasciculata* ATCC 11745, kindly provided by Dr. Seymour H. Hutner, Haskins Laboratories at Pace College, New York.

The following defined medium was used in all experiments, (per liter): K₃citrate 1.0g, citric acid 0.5g, L-malic acid 0.2g, succinic acid 1.0g, MgCO₃ 1.0g, Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O 10.0mg, CaCO₃ 20.0mg, D-sorbitol 15.0g, adenine 20.0mg, beta-glycerophosphate. Na₂ 5 H₂O 10.0g, Ca pantothenate 1.0mg, nicotinamide 1.0mg, Na riboflavin PO₄ 0.6mg, thiamine HCl 0.3mg, biotin 0.004mg, pyri-

doxamine. 2HCl 0.3mg, folic acid 2.0mg, hemin (quadrol 25%) 20.0mg, L-arginine (free base) 0.4g, L-histidine. HCl·H₂O 0.3g, L-isoleucine 0.2g, L-leucine 0.2g, L-lysine. HCl 0.2g, L-phenylalanine 0.2g, L-threonine 0.2g, L-tryptophan 0.1g, L-tyrosine ethylester. HCl 0.2g, L-valine 0.2g, L-methionine 0.1g, Zn 5.0mg as ZnSO₄·7H₂O, Fe 6.0mg as Fe (NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, Mn 5.0mg as MnSO₄·H₂O, Cu 0.4mg as CuSO₄ anhydrous, Mo 2.0mg as (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, V 0.4mg as NH₄VO₃, B 0.1mg as H₃BO₃, Co 0.1mg as CoSO₄·7H₂O; pH 6.5.

The experiments were carried out in 18x150mm test tubes, or in 25.0ml flasks with added volumes of 5.0ml. Ethidium bromide (Sigma Chem. Comp.) was filtered through sterilized Millipore filters. The inocula were prepared from cultures grown at 28°C for 48 hours in the above defined medium. The incubation was carried out for 2 to 6 days at 28°C or 32°C. Growth was estimated in a Klett-Summerson photocolormeter with a 540m μ filter. Results are expressed in Klett units.

R E S U L T S

Growth inhibition of *C. fasciculata* by ethidium — In the absence of the drug there is no significant difference between

(1) Fellow of the National Research Council, Brasil
This work was supported by the Research Council of the Federal University of Rio de Janeiro
(2) Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pasteur, 250;
Rio de Janeiro, Guanabara, Brasil

growth of *C. fasciculata* at 28°C and 32°C. However a remarkable effect of temperature emerged when the flagellate was grown in the presence of ethidium. The drug at the concentration of 0.4mg/l depresses growth at 28°C, whilst at 32°C, the inhibition is much enhanced. At the highest concentration of ethidium used the growth at 32°C was reduced to 18% of control (Table I).

TABLE I

Temperature effect on ethidium inhibition in *Crithidia fasciculata*

Ethidium	Temperature	
	28°C	32°C
No add	425	375
0.4mg/l	385	199
0.6mg/l	350	90
0.8mg/l	126	70

Incubation for 3 days in 25.0ml flasks

Adenine effect on growth inhibition — Many compounds were tested for capacity of neutralizing the inhibitory effect of ethidium on growth *C. fasciculata*. The only substances that showed this effect were purines. Adenine in high concentration had no effect on growth of the flagellate but neutralized the inhibitory effect caused by ethidium (Table II). The effect of adenine appears only after 48 hours from the beginning of the incubation. After 5 days, growth in presence of 0.4mg/l of ethidium plus 100.0mg/l of adenine reached the growth obtained in the absence of the drug (Figure 1).

TABLE II

Protection by adenine against toxic effects of ethidium in *Crithidia fasciculata*

Ethidium	Adenine	
	No add	100.0mg/l
No add	145	152
1.0mg/l	78	144
2.0mg/l	20	128

Incubation for 3 days in 18x150mm tubes at 28°C

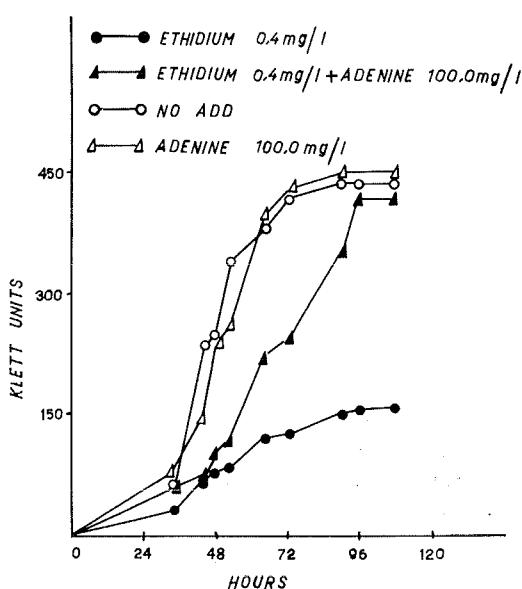


Fig. 1 — Growth curves of *Crithidia fasciculata* in defined medium with ethidium, adenine or both

DISCUSSION

Complex media were used previously in the study of the effect of ethidium on growth of flagellates. Newton⁷ used a peptone-medium to study this effect in *C. oncopheli* and Steinert¹² used tryptose in *C. luciliae*. In the present paper a defined medium was used to test ethidium inhibition in *C. fasciculata* which allow better understanding of the mechanism of action of phenanthridines. A progressive growth inhibition was observed with increasing concentration of ethidium (Table I). This result agrees with others previously reported^{7,12}. The increase of sensitivity of *C. fasciculata* to ethidium with increasing temperature indicates that "in vitro" screening of anti-trypanosomatid drugs may differ if one uses low temperatures or temperatures around that of warm-blooded animals.

Our results on the protective effect of adenine can be related to some observations made in other systems. KANDASWAMY & HENDERSON^{4, 5, 6} showed that ethidium inhibits incorporation of adenine, guanine and hypoxanthine in ascites tumor cells. RAZIN & MAGER⁸ found that ethidium has a deleterious effect on mitochondrial activity and on the oxidative phosphorylation of rabbit red blood cells, thus lowering the intracellular concentration of ATP. According to these authors blockage of preformed compounds incorporation was due to the high

demand of energy apparently required in this process. Further studies are needed to explain adenine protective effect in *C. fasciculata*.

RESUMO

Inibição da Crithidia fasciculata pelo etidium: efeitos da temperatura e da adenina

No presente trabalho foi estudada a ação do brometo de etidium no crescimento da *Crithidia fasciculata*, cultivada em meio definido. Foi demonstrado que a droga inibe o crescimento do flagelado, sendo essa inibição mais pronunciada a 32°C do que a 28°C. A adenina mostrou-se capaz de reverter a inibição do crescimento provocada pelo etidium.

REFERENCES

1. DELAIN, E. & RIOU, G. — Ultrastructure des altérations du DNA du kinétopaste de *Trypanosoma cruzi* traité par le bromure d'éthidium. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **268**:1327-1330, 1969.
2. DELAIN, E. & RIOU, G. — Ultrastructural alterations of the nucleus and the kinetoplast of *Trypanosoma cruzi* exposed to ethidium bromide. *Biochem. Pharmacol.*, **19**:2521-2522, 1970.
3. FORD, E. J. H.; WILMSHURST, E. C. & KARIB, A. A. — Studies on ethidium bromide. I — The treatment of early *T. vivax* infection in cattle. *Vet. Rec.*, **65**:589-590, 1953.
4. KANDASWAMY, T. S. & HENDERSON, J. F. — Intracellular differentiation of purine ribonucleotides derived from endogenous and exogenous sources. *Biochim. biophys. Acta (Amst.)*, **61**:86-93, 1962.
5. KANDASWAMY, T. S. & HENDERSON, J. F. — Alteration of the biochemical effects of ethidium bromide by exposure of cells to hypotonic media. *Nature, (London)*, **199**:807-808, 1963.
6. KANDASWAMY, T. S. & HENDERSON, J. F. — The metabolism of ethidium in normal and neoplastic tissues. *Cancer Res.*, **23**:250-253, 1963.
7. NEWTON, B. A. — The mode of action of phenanthridines: the effect of ethidium on cell division and nucleic acid synthesis. *J. gen. Microbiol.*, **17**:718-730, 1957.
8. RAZIN, A. & MAGER, J. — Studies on the mechanism of the inhibitory effect of ethidium bromide on purine nucleotide metabolism. *Israel J. Chem.*, **2**:5-14, 1964.
9. RIOU, G. — Induction d'une "diskinéoplasie" par le bromure d'éthidium chez *Trypanosoma cruzi* cultivé in vitro. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **265**:2004-2007, 1967.
10. RIOU, G. — Disparition de l'ADN du kinétopaste de *Trypanosoma cruzi* cultivé en présence du bromure d'éthidium. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **266**:250-252, 1968.
11. STEINERT, M. — Altérations réversible et irréversible du kinétopaste de *Crithidia luciliae* traitée par le bromure d'éthidium ou l'acriflavine. *Arch. Int. Physiol. Biochem.*, **76**:385-386, 1968.
12. STEINERT, M. — Specific loss of kinetoplasmatic DNA in Trypanosomatidae treated with ethidium bromide. *Exptl. Cell. Res.*, **55**:248-252, 1969.
13. UNSWORTH, K. — The curative effect of ethidium bromide against *Trypanosoma vivax* infections of Zebu cattle in West Africa, with observations on the toxicity of the drug. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **48**:229-236, 1954.
14. WARING, M. J. — Drugs which affect the structure and function of DNA. *Nature (London)*, **219**:1320-1325, 1968.

Recebido para publicação em 24/10/1971.

CUTANEOUS STREPTOTHRICOSIS IN BRAZILIAN CATTLE

Olga FISCHMAN ⁽¹⁾, M. A. S. C. PORTUGAL ⁽²⁾ & Isau Gouveia ARANTES ⁽³⁾

S U M M A R Y

An outbreak of bovine dermatophilosis in 9 countries in the Alta Araraquarense region of São Paulo (Brazil) was studied from January to December, 1970.

One hundred and forty-three (6.08%) animals out of 5000 beef cattle showed typical skin lesions of dermatophilosis. Among these most of them were young animals. Climate conditions, humidity and heavy rainfall may be related to the occurrence of the disease among cattle.

Further studies must be undertaken to determine how far the disease has already spreaded out among our herds mainly considering its economic and public health importance in the raising beef cattle areas.

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

There are few reports of dermatophilosis in Brazil. It was first described by d'APICE, in 1962 (Personal communication). Later on, epizootics in cattle have been reported in Minas Gerais ^{2, 16}, Rio Grande do Sul ¹² and São Paulo ^{15, 19}.

Though clinical symptoms of disease are suggestive, diagnosis requires microscopic examination of stained exudate, crusts or scales smears in order to disclose *Dermatophilus congolensis*. Besides this it is advised to inoculate the specimens on the recommended media for isolating the microorganism.

Although mycologists who studied the matter ^{1, 10, 12, 23} agree that *D. congolensis* looks more like a fungus, research works performed on the electron microscopy showed that the microorganism might be a bacteria ⁹.

AUSTWICK ¹ proposed 3 different species: *D. congolensis*, *D. dermatonomus* and *D. pedis* as agents respectively of streptothrichosis in cattle, horses, sheep; mycotic der-

matitis in sheep; and strawberry foot rot in sheep. Later on, GORDON ⁸ who studied 17 strains of *Dermatophilus* of man, deer, cattle and sheep origin, compared their condition of growth, biochemical reactions and micromorphology and concluded that there was only one valid species of *D. congolensis* which is now accepted by most of the experts on the subject.

This paper reports an outbreak of dermatophilosis which occurred in the Alta Araraquarense region, comprising 9 countries (Riolândia, Cedral, Palestina, São José do Rio Preto, Onda Verde, Indiaporã, Poloni, Olimpia, Nova Aliança) between January and December of 1970 (Figure 1).

MATERIALS AND METHODS

A total of 5000 beef cattle from 10 farms of 9 countries were carefully submitted to clinical examination for skin lesions. One hundred and forty-three animals showed suggestive lesions of dermatophilosis. Scales and crusts were removed from 39 of them and examined microscopically after Giemsa

(1) Departamento de Parasitologia e Microbiologia. Escola Paulista de Medicina. Rua Botucatu, 862. São Paulo, Brasil

(2) Veterinário. Instituto Biológico. São Paulo, Brasil. Bolsista do CNPq

(3) Veterinário Regional. Secretaria da Agricultura. São José do Rio Preto. São Paulo, Brasil.

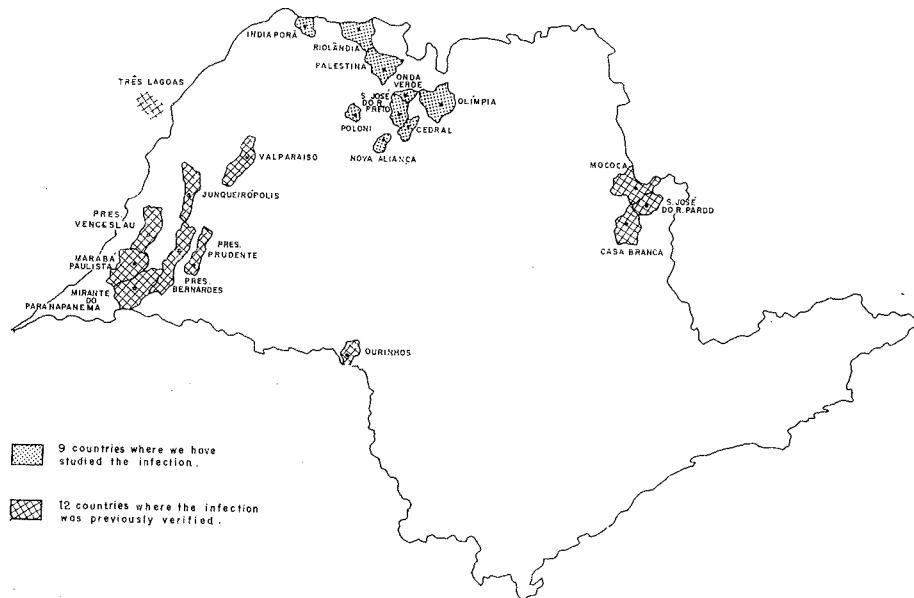


Fig. 1 — Distribution of dermatophilosis outbreaks in São Paulo countries

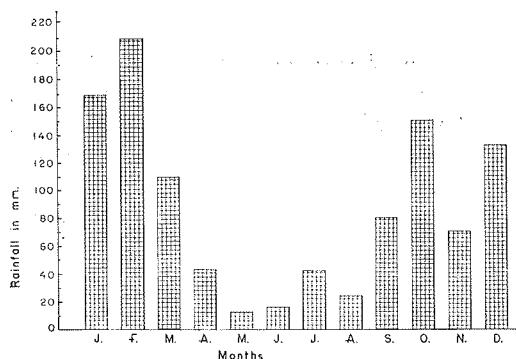


Fig. 2 — Rainfall data during the year 1970, provided by the Agricultural Service

staining. All positive specimens were cultured on blood agar and Roberts' medium²¹ and incubated at 37°C.

The following tests were performed with the isolates: methyl red reaction, litmus milk coagulation, H₂S, urease and indole production, gelatin hydrolysis, nitrate reduction, citrate and ligneres utilization and acid and or gas production from maltose, dextrose, sucrose, manose, dextrin, lactose, mannitol, arabinose, adonitol, inositol, dulcitol, xylose, laevulose, raffinose, sorbitol, salicin and rhamnose. The inoculum for all tests was taken from 48 hours Roberts' medium cultures. As a basic medium for the carbohydrate fermentation tests it was used 1% peptone, 0.5% NaCl, 0.3% beef

extract. Carbohydrates were used at the concentration (w/v) of 1%. Readings were made after 48, 96 and 144 hours of incubation at 37°C. Experimental infection was attempted by intraperitoneal inoculation in two guinea-pigs.

RESULTS

The direct microscopic examination of crusts and scales revealed *D. congolensis* in all cases. Attempts to isolate the agent were successful with all specimens. The microscopic characteristics of the cultures were identical of those verified in clinical materials (Figure 3). All the isolates presented the same biochemical characteristics. Table I shows the results of the biochemical tests.



Fig. 3 — Micromorphology of *D. congolensis* in skin smear, Giemsa stain X1000

T A B L E I
Biochemical characteristics of 39 isolates of
D. congolensis

Tests	Reactions of 39 isolates tested at		
	48 hrs	96 hrs	144 hrs
Maltose	—	—	+
Dextrose	—	+	+
Sucrose	—	+	+
Manose	—	+	+
Dextrin	—	+	+
Lactose	—	—	—
Mannitol	—	—	—
Arabinose	—	—	—
Adonitol	—	—	—
Inositol	—	—	—
Dulcitol	—	—	—
Xylose	—	—	—
Laevulose	—	—	—
Raffinose	—	—	—
Sorbitol	—	—	—
Salicin	—	—	+
Rhamnose	—	—	—
Methyl red reaction	+	+	+
Litmus milk coagulation	—	—	—
H ₂ S production	—	—	—
Urease production	—	—	—
Indole production	—	—	—
Simmons citrate utilization	—	—	—
Gelatin hydrolysis	—	—	—
Nitrate reduction	—	—	—
Ligneres utilization	Growing as an inverted pine-tree		

Guinea-pigs inoculated with two out of thirty-nine isolates died after nine days showing at necropsy, liver congestion and peritoneal exudate. *D. congolensis* was recovered by culturing ground liver on Roberts' medium.

In all farms, except two (Indiaporã and Palestina) the infected animals were young ones. In most farms over fifty per cent of the calves were affected. Loss of weight was a very common symptom and mortality occurred in some farms.

D I S C U S S I O N

Since dermatophilosis was first described in cattle from the Belgian Congo, in 1915²³, it has been shown to be worldwide in distribution^{1, 6, 7, 14, 24}. The disease was not reported in the New World until 1961⁵. In South America there are reports of infection in Colombia¹⁴, Argentina¹² and Brazil^{2, 12, 15, 19}. Although described only in three Brazilian States (Minas Gerais, São

Paulo and Rio Grande do Sul) dermatophilosis in cattle has also been verified in Três Lagoas, Mato Grosso. (PORTUGAL, personal communication).

We have studied bovine dermatophilosis in the Northwest of São Paulo, during the year 1970, where we searched for mycotic lesions in livestock animals.

Figure 1 shows São Paulo countries where the infection was previously reported and the areas where we have observed and studied the disease.

Heavy rainfall over prolonged periods during 1970, from January to March and from October to December, was coincident with the peak of infection. Climatic data of the studied region was given by the Agricultural Service and are presented in Figure 2. Heavy rainfall may be a factor which helps the transmission of the disease^{10, 12}. Other factors which contribute to spread the infection seem to be the presence of ticks^{10, 12, 18} and skin traumatism caused by branches of trees²⁴. RICHARD & PIER²⁰ described in experimental conditions the transmission of *D. congolensis* by flies from infected to normal rabbits.

In the earlier stages an exudative dermatitis was first observed followed by the formation of alopecia areas covered by scales and crusts. Afterwards the hairs became stiff and matted together as a bundle, giving the appearance of crocodile's skin. As the infection progressed the crusts got thicker, larger, confluent and covered all the body of the sick animals (Figure 4). Nodular lesions were not observed, a fact which agrees with LONDERO's et al.¹² findings.



Fig. 4 — Bovine dermatophilosis, generalized crusty lesions, with the appearance of a crocodile skin

The morphological data presented by *D. congolensis* are similar to those of other investigators. A few differences in physiological properties were observed. Although GORDON⁸ reported the MR test as a negative one and the production of urease as positive, our isolates showed to be MR+ as PEREZ CATAN & Di Rocco's¹⁷ isolates and didn't produce urease. AUSTWICK¹ also reported litmus milk coagulation. GORDON⁸ stated that none of *D. congolensis* isolates produced acid from salicin and sucrose and reduce nitrate to nitrite, which differs from our observations. On the other hand, all strains reduced nitrate to nitrite as verified by SHOTTS *et al.*²².

Dermatophilosis in cattle constitutes an important public health problem, specially in areas where raising livestock is a major industry, such as Alta Araraquarense, because loss of weight and mortality are related to the disease. Studies must be carried out in order to know how the infection spreads for its incidence appears to be very high.

In Brazil the disease has been reported also in sheep^{3, 11}, horses^{4, 13} and goats³. Although we have looked for the disease in other animals and human beings, besides cattle, only the latter were found to be sick.

R E S U M O

Dermatofilose em bovinos no Brasil

Um surto de estreptotricose cutânea em bovinos de 9 municípios da Alta Araraquarense (São Paulo, Brasil) foi estudado de Janeiro a Dezembro de 1970.

Foram examinados 5000 animais de cordeiros, das raças Gir e Nelore. Em 6,08% foram encontradas lesões superficiais de dermatofitose. A maior parte do gado doente tinha de 3 meses a um ano de idade e a infecção atingiu até 50% do total dos bezerros. O *D. congolensis* foi encontrado ao exame direto das crostas e escamas e isolado de 39 animais examinados. As 39 amostras foram caracterizadas bioquimicamente e duas investigadas, mostraram-se patogênica por inoculação intraperitoneal.

R E F E R E N C E S

1. AUSTWICK, P. K. C. — Cutaneous streptothrichosis, mycotic dermatitis and strawberry foot rot and the genus *Dermatophilus* Van Saceghem. *Vet. Rev. Annot.*, 4:33-48, 1958.
2. BARBOSA, M.; CARVALHO, C. M. F. & ROCHA, F. N. — Estreptotricose cutânea em bovinos do Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 19:15-17, 1967.
3. BARBOSA, M.; MOREIRA, E. C. & KASSAI, Y. — Dermatofilose em caprinos e ovinos no município de Felixlândia, Minas Gerais, Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 20:149-153, 1968.
4. BARBOSA, M.; MOREIRA, E. C.; MOREIRA, Y. K. & FONSECA, I. C. Dermatofilose em eqüinos no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 22:227-229, 1970.
5. BRIDGES, C. N. & ROMANE, W. M. — Cutaneous streptothrichosis in cattle. *J. Amer. vet. med. Ass.*, 138:153-157, 1961.
6. BUCK, G. — Actinomycose ou streptothrichosis des bovines à Madagascar (Drodro, Boka). *Bull. Off. Int. Epiz.*, 29:117-121, 1948.
7. CHODNICK, K. S. — Mycotic dermatitis of cattle in British West-Africa. *J. comp. Path.* 66:179-186, 1958.
8. GORDON, M. A. — The genus *Dermatophilus*. *J. Bact.*, 88:509-522, 1964.
9. GORDON, M. A. & EDWARDS, M. R. — Micromorphology of *Dermatophilus congolensis*. *J. Bact.*, 86:1101-1115, 1963.
10. KAPLAN, W. — Dermatophilosis. A recently recognized disease in the United States. *Southwest. Vet.* 20:14-19, 1966.
11. LONDERO, A. T.; RAMOS, CECY D. & SANTIAGO, M. — Dermatite micótica (estreptotricose) em ovinos de Itaquí (Rio Grande do Sul). *Rev. Med. vet.*, 2:109-112, 1966.
12. LONDERO, A. T.; RAMOS, CECY D. & SANTIAGO, M. — Dermatophilosis in cattle from Rio Grande do Sul (Brasil). *Mykosen*, 11:25-28, 1968.
13. LONDERO, A. T.; SANTIAGO, M. & RAMOS, CECY D. — Dermatite micótica em eqüino. *Rev. Med. vet.*, 3:77-79, 1967.
14. LUQUE, F. G. — Streptothrichosis bovina en Colombia. *Rev. Med. vet.*, 15:1-19, 1946.
15. MARTINS, F. A.; MENGATO, W.; MORITA, T. & PORTUGAL, M. A. S. C. — Considerações sobre recente surto de dermatite contagiosa. *O Biológico*, 37:49-55, 1971.
16. MOREIRA, E. C.; BARBOSA, M.; MOREIRA, Y. K. & FONSECA, I. C. — Contribuição ao estudo da epidemiologia da dermatofilose bovina no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Arq. Esc. Vet. Univ. Fed. M. Gerais*, 22:249-263, 1970.
17. PEREZ CATAN, E. & DI ROCCO, M. — Caracteres diferenciales entre las cepas *Dermatophilus congolensis* y *D. dermatonomus*. *Rev. Invest. Ganad. (Bs. As.)* 16:71-80, 1962.

18. PLOWRIGHT, W. — Cutaneous streptothricosis of cattle. I. Introduction and epizootiological features in Nigeria. *Vet. Rec.*, **68**:350-355, 1956.
19. PORTUGAL, M. A. S. C. — Estreptotricose em bovinos. Ocorrência e isolamento do agente. *Arg. Inst. Biol.*, **37**:143-156, 1970.
20. RICHARD, L. & PIER, A. C. — Transmission of *Dermatophilus congolensis* by *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica*. *Am. J. vet. Res.*, **27**:419-423, 1966.
21. ROBERTS, D. S. — The life cycle of *Dermatophilus dermatonomus*, the causal agent of ovine mycotic dermatitis. *Aust. J. exp. Biol. med. Sci.*, **39**:463-476, 1961.
22. SHOTTS, E. B.; TYLER, D. E. & CHRISTI, J. E. — Cutaneous streptothricosis in a bull. *J. Amer. vet. med. Ass.*, **154**:1450-1454, 1969.
23. VAN SACEGHEM, R. — Dermatose contagieuse (Impétigo contagieux). *Bull. Soc. Path. exot.*, **8**:354-359, 1915.
24. ZLOTNICK, T. — Cutaneous streptothricosis in cattle. *Vet. Rec.*, **67**:613-614, 1955.

Recebido para publicação em 27/9/1971.

PROTECTIVE EFFECT OF *LEPTOMONAS PESSOAI* AGAINST THE INFECTION OF MICE BY *TRYPANOSOMA CRUZI*

Maria do Carmo Moreira SOUZA⁽¹⁾ & Isaac ROITMAN⁽²⁾

S U M M A R Y

The *Trypanosoma cruzi* infection of mice was followed in two groups of animals. One of them was injected previously to the infection, with a living suspension of *Leptomonas pessoa*, an insect trypanosomatid. A high degree of protection as determined by parasitemia and death rates was shown in the vaccinated group in comparison with the control.

IN T R O D U C T I O N

Attempts have been made to protect mice against *Trypanosoma cruzi* infection by use of living trypanosomes. Mice infected with "T. cruzi-like" flagellates isolated from animals — opossums, raccoons and skunks — as well as with avirulent human strain of *T. cruzi* survived a challenge exposure to the lethal human Tulahen strain of *T. cruzi*¹⁰. KAGAN & NORMAN⁴, showed that mice vaccinated with a trypanosome from opossum were completely protected against *T. cruzi* infection only 28 days after the vaccination, but not in shorter periods. Recently Menezes⁶, using an avirulent strain of *T. cruzi* maintained in culture media since 1953, demonstrated a high degree of protection of mice against a subsequent infection with virulent blood forms of the same parasite. This avirulent strain protected dogs⁷ and mice infected with several strains of *T. cruzi*⁸. Using *T. lewisi* as vaccine GARCIA & MUHLFORT³ demonstrated the protection against the infection by *T. cruzi* in rats. However mice inoculated with blood forms of *T. lewisi* were not resistant to the *T. cruzi* infection⁵. In the present report we suggest the insect trypanosomatid as a living vaccine for the protection of mice from the infection by *T. cruzi*.

MATERIALS AND METHODS

Strain used — The insect trypanosomatid used as vaccine, *Leptomonas pessoa*, was isolated from *Zelus leucogrammus* by Galvão et al², and maintained in a culture medium with the following composition: trypticase 0.5%, yeast extract 0.7%, glucose 1.5%, hemin 2.0 mg% and folic acid 0.2 mg%, pH 7.0.

The *T. cruzi* strain used for the experimental infection was the "Y" strain, originally isolated from a human case of Chagas' disease and maintained in mice. Transfers were made at intervals of 8 days.

Immunization procedure — *L. pessoa* was grown in the above medium for 48 hours at 28°C, and the cells thus obtained were washed three times with NaCl (0.85%) and resuspended in saline, up to a concentration of 2.0×10^6 to 5×10^6 cells/ml. The following sequence for the immunization of mice was used with the inoculations being made at 7 days intervals: a) 0.2ml in the footpad; b) 0.2ml in the thigh muscle; c) 0.2ml in the peritoneum; d) same as in c); e) same as in c). Ten male mice, aging from 40 to 45 days, weighing an average of 23.7g, were immunized having another group of ten animals been used as control.

(1) Instituto de Patologia Tropical, Universidade Federal de Goiás. Av. Universitária s/nº, Goiânia, Goiás, Brasil

(2) Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Av. Pasteur, 250; Rio de Janeiro, Guanabara, Brasil

Infection with *T. cruzi* — After seven days of the last vaccine injection, the animals were inoculated intraperitoneally with 0.2ml of a suspension of the "Y" strain of *T. cruzi* containing 420.000 trypanosomes/ml. The same procedure was followed in the control group.

Number of parasites — The determination of the number of parasites was made by collecting blood from the mouse tail and the trypanosomes counted by the method described by BRENNER¹. The death rate of the animals was followed up to the 35th day after the inoculation of the virulent strain.

RESULTS

After 8 days of the infection with the virulent strain of *T. cruzi* the number of parasites in the blood of the control group was high in comparison with the vaccinated animals. In later periods the number of parasites did not increase in the vaccinated group while it was more than doubled in the control (Figure 1). On the 18th day after the infection 90% of mice of the control group had died while in the vaccinated group only one mouse had died after 30 days (Figure 2).

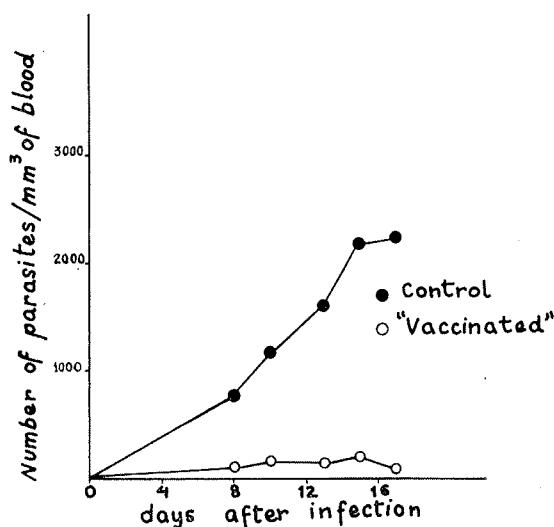


Fig. 1 — Parasitemia (average) of *Trypanosoma cruzi* in mice with and without previous immunization with *Leptomonas pessoai*

DISCUSSION

Use of avirulent strains of *T. cruzi* as vaccine to prevent Chagas' disease is sugges-

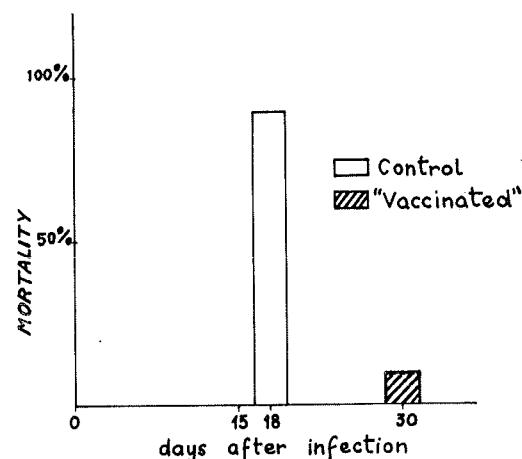


Fig. 2 — Mortality of mice infected with *Trypanosoma cruzi* with and without previous immunization with *Leptomonas pessoai*

tive as pointed out by MENEZES⁹ who inoculated humans with the avirulent PF strain. However, vaccines using insect flagellates instead, seem to be safer. It was shown that *L. pessoai* is unable to infect laboratory animals². Our results using *L. pessoai* as vaccine indicate the same high degree of protection of mice challenged with a virulent strain of *T. cruzi*, much like the one observed by MENEZES⁶ with an avirulent *T. cruzi* vaccine. Some relation between *L. pessoai* and *T. cruzi* antigens (Souza — unpublished results) was shown by precipitation. The ability of an insect flagellate to protect mice against *T. cruzi* infection should stimulate further studies on the cross immunizing properties of living trypanosomatids. The sequence of immunization used was similar to the one used by GARCIA & MUHLFORT³. The possibility of lowering the number of protective injections, the use of younger mice, with increased sensitivity to the *T. cruzi* infection, as well as the protection of others animals should be further studied.

RESUMO

Efeito protetor da Leptomonas pessoai contra a infecção de rato pelo Trypanosoma cruzi

Dois grupos de camundongos foram submetidos à infecção por *Trypanosoma cruzi*. Um dos grupos não recebeu qualquer tratamento, enquanto outro foi inoculado com uma suspensão viva de um tripanosomatídeo isolado de inseto, *Leptomonas pessoai*. O

grupo não tratado foi mais susceptível à infecção, estimada pela parasitemia e mortalidade.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank Dr. Archibaldo B. Galvão for all the encouragement given during the investigation as well as Mrs. Raquel L. Oliveira for technical assistance.

REFERENCES

1. BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da Doença de Chagas — Tese, Belo Horizonte, 1961.
2. GALVÃO, A. B.; OLIVEIRA, R. L.; CARVALHO, A. L. M. & VEIGA, G. P. — *Leptomonas pessoai* s.p.n. (Trypanosomatidae, Kinetoplastida, Protozoa). *R. goiana Med.*, **16**:229-236, 1970.
3. GARCIA, W. & MUHLFORT, H. — Infección de *Trypanosoma cruzi* en ratones después de su tratamiento con *Trypanosoma lewisi*. *R. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **11**:13-18, 1969.
4. KAGAN, G. I. & NORMAN, L. — Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi* I-Susceptibility of CFW stock mice for the "tulahen" strain of *T. cruzi*. *J. infet. Dis.*, **107**:165-167, 1960.
5. KLOETZEL, J. & DEANE, M. P. — Protective cross-immunity between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma lewisi*. *R. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **13**:31-36, 1971.
6. MENEZES, H. — Protective effect of an avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against experimental infection in mice. *R. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **10**:1-4, 1968.
7. MENEZES, H. — Active immunization of mice with the avirulent y strain of *Trypanosoma cruzi* against heterologous virulent strains of the same parasite. *R. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **11**:335-342, 1969.
8. MENEZES, H. — Active immunization of dogs with a non virulent strain of *Trypanosoma cruzi*. *R. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **11**:258-263, 1969.
9. MENEZES, H. — Aplicação de vacina viva avirulenta de *Trypanosoma cruzi* em seres humanos. *R. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, **13**:144-154, 1971.
10. NORMAN, L. & KAGAN, G. I. — Immuno-logic studies on *Trypanosoma cruzi* II — Acquired immunity in mice infected with avirulent american strains of *T. cruzi*. *J. infet. Dis.*, **107**:168-174, 1960.

Recebido para publicação em 20/9/1971.

ON THE USE OF VON KROGH'S LOGISTIC EQUATION IN THE QUANTITATIVE COMPLEMENT FIXATION TEST

José Oliveira de ALMEIDA ⁽¹⁾

S U M M A R Y

The amounts of immune-complex required for 50% hemolysis with a given amount of complement, can be determined graphically or arithmetically, from the linear relationship between logarithms of the volumes of serum (or antigen) and the logits of hemolysis. The von Krogh's logistic equation should be used for the analysis of the data obtained in this bioassay and its parameters determined by the least square method. Tables are presented for easier computation, saving labor and time.

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

When a quantal response is involved, as in hemolysis, the percentage of lysis is a logistic function of the concentration of complement added. The von KROGH¹³ relation has been used for such assays, for the determination of the amount of complement required, under given conditions, for 50% hemolysis:

$$\log K = \log x - h \log \left(\frac{y}{1-y} \right) \quad (1)$$

where x is the amount of complement producing y of hemolysis; K the amount of complement for 50% hemolysis and h the slope of the linear relationship between $\log x$ and logits of y .

Since in many systems h is a function of K , the computation of K is based on the previous knowledge of the median value of h , determined in reasonable number of observations. Tables are prepared for each system in order to determine the value of K , when x and y are known^{17, 18, 20}.

When the slope (h) of the reaction curve differs from the median value by which table was built error may be introduced in the determination of the titer of the immune complex. In those cases these "atypical

reactions" should be evaluated by graphic method².

The amounts of complement required for 50% hemolysis ($K'_{S,A}$) when plotted against the volume of serum (or antigen) determine points in a straight line²⁰. From this line, the titer of the immune-complex is computed as the amount of complement required for 50% hemolysis, in reactions with an arbitrary volume of reagent (0.05ml for serum and 0.1ml for antigen)^{16, 17, 19, 20}.

The slope of this linear relationship can be taken as the titer of the immune-complex, either in terms of serum or in terms of antigen¹⁶.

For this purpose it seems highly desirable to evaluate the amounts of the reagent (serum or antigen) required for reactions presenting 50% hemolysis, with different amounts of complement, rather than use the estimated values of $K'_{S,A}$ ¹⁹.

The logistic function may be used for the evaluation of the amount of immune-complex F_K required for 50% hemolysis, for each amount of complement added. The assay is done with varying amounts of immune-complex (F) reacting with different doses of complement:

(1) Head of the Department of Parasitology, Microbiology and Immunology. Faculty of Medicine. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

$$\log F = \log F_K + h'_F \log \left(\frac{y}{1-y} \right) \quad (2)$$

When $\log F$ are plotted in ordenates, against the logits of y the points fall in a straight line. From this line the amount of immune-complex (in terms of serum of antigen) required for 50% hemolysis (F_K) can be determined for each amount of complement added.

This plotting provides a test for "goodness of fit" of the line representing the dosage-effect curve, being a definite aid for detection of erratic points, due to technical errors.

The parameters of the line, F_K and h'_F can be determined by the least square method, thus avoiding the introduction of error in drawing the regression line.

By the least square method, two regression lines can be drawn⁴, one minimizing the errors in F and the other, the errors in y .

It is preferable to minimize the sum of squares of deviations of observed values of

$$Y = \log \left(\frac{y}{1-y} \right), \text{ rather than minimizing}$$

the sum of squared deviations of observed values of $X = \log F$, as used for complement titrations¹².

Let X denote $\log F$, a denote $\log F_K$, b as h'_F and $Y = \log \left(\frac{y}{1-y} \right)$. Then the equation (2) can be expressed as:

$$X = a + b \cdot Y$$

By applying the least squares deviations method the values a and b are evaluated as:

$$a = \frac{SX^2 \cdot SY - SX \cdot SXY}{SX \cdot SY - nSXY} \quad (3)$$

$$b = \frac{(SX)^2 - nSX^2}{SX \cdot SY - nSXY} \quad (4)$$

where n is the number of observations.

When geometric dilutions of the reagent (serum or antigen) are used, a more con-

venient variate X' can be used in place of X . So, if $F_{t+1} = R \cdot F_t$ where t is the number of the tube in the series of dilutions and R the dilution factor, X' can be taken as t minus an arbitrary constant so that the values of X' are simply small integers in natural number sequence.

The parameter a gives the position of the tube with F'_K required for 50% hemolysis. The amount of F'_K is calculated as:

$$\log F'_K = \log F_1 - (n-l) \log R \quad (5)$$

where F_1 is the volume of reagent present in the first tube of the dilution series; n is the position of the tube with F'_K and l is equal to a plus an arbitrary constant used for computation of X' .

The determination of b can also be simplified since the numerator for equation (4) depends only of the number of observations, n . Then,

$$b = \frac{"A"}{SX' \cdot SY - nSXY} \quad (6)$$

The value of h'_F of the equation (2) is:

$$h'_F = b \cdot \log R \quad (7)$$

Is the following example of a serum titration, the graphic and the arithmetical method are applied.

Example of a serum titration

A very convenient procedure for making geometrical dilutions, is to prepare a initial dilution of the reagent (serum or antigen), from which a stipulated volume is taken, with a volumetric pipette, to the first tube of the series. Then the volume is reconstituted by adding diluent. After mixing, by rotation of the flask, the same volume is taken to a second tube of the series and the process continues till the desired number of dilutions is prepared.

In the serum titration presented in Table I, the dilutions were prepared from 4 ml of inactive Chagasic serum, in a French square bottle. With on Ostwald type pipette, 1.0ml of this serum was transferred to the first tube of a series of test tubes; then, 1.0ml of 1/5 dilution of normal serum, in borate-buffered saline, was added to the flask. The contents was mixed well by tilting and gently rotating the bottle. Another 1.0ml of the diluted serum was put to the second

test tube and the volume again reconstituted by adding 1.0 ml of diluent.

TABLE I

Titration of a Chagasic serum. Reactions observed with 5 and 7.5 units of complement

with 5 units C'		with 7.5 units C'	
Tube n. ^o	Hemolysis %	Tube n. ^o	Hemolysis %
8	10-15	7	15-20
9	20-20	8	25-30
10	30-35	9	45-50
11	50-50	10	70-70
12	60-60	11	80-80
		12	85-90

This process was repeated until 12 dilutions were prepared.

Determination of the serum titer

The titer of the serum is the slope of the linear relationship between complement and serum^{1, 16}:

$$T_S = \frac{\Delta C'}{\Delta S}$$

The evaluation of the amount of serum required for 50% hemolysis with 5 and 7.5 units of complement, can be done by graphic method or by arithmetical computation.

By the graphic method, the degree of hemolysis are plotted as logits, against the

number of the tube in the dilution series, in the arithmetic-logit paper (*n.^o* 32450 from Codex Book Co. Norwood, Mass.).

Through the points, a straight line is drawn by inspection. The intersection of the line with the abscissa corresponding to 50% hemolysis determine the position of the tube containing serum required for such degree of hemolysis. From Figure 1 these points correspond: for reactions with 5 units of complement to the 11.2nd tube and for reactions with 7.5 units to the 9.2nd tube.

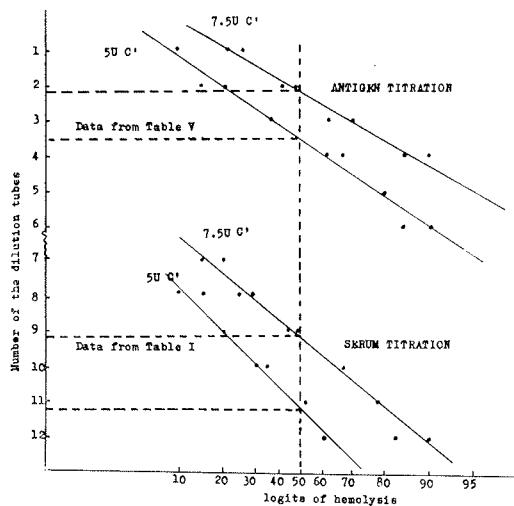


Fig. 1 — Plotting of logarithms of the amounts of immune-complex (in terms of serum or antigen) against logarithms of hemolysis

The amounts of serum corresponding to nth tube can be determined by using Table II, thus avoiding the arithmetical calculation of F'_K .

TABLE III

Volume of serum required for fifty per-cent hemolysis, determined by the position of the tube in the dilution-series

	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	
ml x 10 ⁻⁴	geometric series of dilutions by the factor 1.33.										ml x 10 ⁻³
1. ^o	500	486	472	459	446	433	421	409	397	386	9. ^o
2. ^o	375	364	354	344	334	325	315	306	298	289	10. ^o
3. ^o	281	273	266	258	251	243	237	230	224	217	11. ^o
4. ^o	211	205	199	193	188	182	178	172	168	162	12. ^o
5. ^o	158	153	149	145	141	137	133	129	125	122	13. ^o
6. ^o	119	115	112	109	106	103	102	102	102	101	14. ^o
7. ^o	89	86	84	82	79	77	75	73	71	69	15. ^o
8. ^o	67	65	63	61	59	58	56	55	53	52	16. ^o

These amounts of Chagasic serum required for 50% hemolysis, respectively for reactions with 5.0 and 7.5 units of complement are 0.00266ml and 0.00472ml.

Then,

$$T_s = \frac{7.5 - 5.0}{0.00472 - 0.00266}$$

$$T_s = 1214$$

For the determination of the parameters a and b of the equations (3) and (4) it is necessary to compute the values of SX' , SY , SX'^2 , $S'Y$, $(SX')^2$ and "A" for the various degrees of hemolysis, in a number n of observations. This can be done with the aid of Table III.

In Table IV the determination of the parameters a and b for the reactions of the given example (Table I) with 5 units of complement, is shown.

TABLE III

Values corresponding to degrees of hemolysis and the number of observations for determining the parameters of the logistic relation

X'	SX'	SX' ²	A	Hemolysis % = y							
				10-90	15-85	20-80	25-75	30-70	35-65	40-60	45-55
				logit y = Y							
				.954	.753	.602	.477	.368	.269	.176	.087
1	-1	1	-	.954	.753	.602	.477	.368	.269	.176	.087
2	-3	5	-1	1.908	1.506	1.204	.954	.736	.538	.352	.174
3	-6	14	-6	2.862	2.259	1.806	1.431	1.104	.807	.528	.261
4	-10	30	-20	3.816	3.012	2.408	1.908	1.472	1.076	.704	.348
5	-15	55	-50	4.770	3.765	3.010	2.385	1.840	1.345	.880	.435
6	-21	91	-105	5.724	4.518	3.612	2.862	2.208	1.614	1.056	.522
7	-28	140	-196	6.678	5.271	4.214	3.339	2.576	1.883	1.232	.609
8	-36	204	-336	7.632	6.024	4.816	3.816	2.944	2.152	1.408	.696
9	-45	285	-540	8.586	6.777	5.418	4.293	3.312	2.421	1.584	.783

The values of Y are negative for hemolysis less than 50 per-cent.

TABLE IV

Protocol of a serum titration

Tube n. ^o	X'	y	Y	X'Y	Data from Table III		
8. ^o	1	10-15	-0.853	-0.853			
9. ^o	2	20-20	-0.602	-1.204	n = 5	SX' ² = 55	
10. ^o	3	30-35	-0.318	-0.954	SX' = 15	A = 50	
11. ^o	4	50-50	0.000	0.000			
12. ^o	5	60-60	0.176	0.880			

$$SY = -1.597 - 2.131 = SX'Y$$

$$X' = (n^{th} \text{ tube} - 7)$$

Applying the relations (3):

$$a = \frac{((55)(-1.597)) - ((15)(-2.131))}{((15)(-1.597)) - ((5)(-2.131))}$$

$$a = 4.1$$

Then 7 is added to a, in order to determine the position of the tube showing 50% hemolysis. With the aid of Table II, the amount of serum required for 50% hemolysis, $F'_{K'}$, in the reaction with 5 units of complement was found to be 0.00273ml.

The slope of the line is calculated applying the relation (6):

$$b = \frac{50}{-13.3}$$

$$b = -3.76$$

Then

$$h'_F = b \cdot (-0.125)$$

$$h'_F = 0.47$$

where -0.125 is the log of the dilution ratio.

For the reactions with 7.5 units of complement, the amount of serum required for 50% hemolysis was found to be 0.00486ml and $h'_F = 0.39$.

The serum titer was determined as:

$$T_s = \frac{7.5 - 5.0}{0.00486 - 0.00273}$$

$$T_s = 1173$$

The two values found for the slopes of the regression lines are nearly equal, showing that the lines are almost parallel to each other.

Example of antingen titration

In the antigen titration, the Chagasic serum was used undiluted, in order to provide an excess of antibodies, being the antigen the limiting factor in the reaction. For that purpose, two-fold dilutions of the antigen were prepared in borate-buffered saline, and the titration was carried out with two doses of complement, as in the serum titration. Table V presents a protocol of an antigen titration, performed with 5 and 7.5 units of complement. The first tube of the dilution series contains antigen diluted 1/16.

T A B L E V

Protocol of an antigen titration. Initial dilution of *T. cruzi* antigen was 1/16

Tube n. ^o	Reactions with 5 units C'		Reactions with 7.5 units C'	
	Hemolysis %	Tube n. ^o	Hemolysis %	Tube n. ^o
1	10-10	1	20-25	
2	15-20	2	40-45	
3	35-35	3	60-70	
4	60-65	4	85-90	
5	80-80			
6	85-90			

By using the same methodology, the degrees of hemolysis are plotted against the number of the corresponding tubes, in the graphic paper, as it is shown in Figure 1.

The values for a determined by the least squares confirmed those found by graphic method. Once found the number (n) of the tube corresponding to 50% hemolysis, the amount of antigen (L) present is calculated as follows:

$$\log L = \log W - (n-l) \log q$$

where W is the amount of antigen present in the first tube of its dilution series and q is the dilution factor.

In the example given, the amounts of antigen required for 50% hemolysis with 5.0 and 7.5 units of complement were respectively 0.00103ml and 0.00254ml.

The antigen titer is calculated:

$$T_A = \frac{\Delta C'}{\Delta A}$$

$$T_A = \frac{2.5}{0.00151} = 1656$$

The slopes of the regression lines for 5 and 7.5 units of complement are calculated as previously described and were found to be respectively 0.79 and 0.65.

D I S C U S S I O N

The rectification of the sigmoid curves described by MANWARING¹⁴ was done by von KROCH¹⁸ who plotted hemolysis as logits and the amounts of complement as logarithms. The von Krogh's relation was

used in the pioneer work of WADSWORTH et al.²⁰, in the quantitative complement-fixation tests.

The von Krogh's equation has been employed for the determination of the parameters of the hemolytic curve in complement titration and for the evaluation of the amount of complement required for 50% hemolysis, when the amount of complement added is known. Conversion factor tables, based on the median values for each complement-fixation system, were built^{9, 18, 20} for the determination of the number of units of complement required for 50% hemolysis, with varying amounts of complement added, by knowing the degree of hemolysis and the slope of the hemolytic curve, for each particular system and condition, as time and temperature of the incubation. When the slope of the hemolytic curve is significantly different from those by which the conversion factors were calculated, the use of tables may introduce errors in the computation of serum or antigen titer. In these "atypical reactions" the value of $K'_{S,A}$ ¹⁹ can be determined by graphic method².

Since the logistic equation of von Krogh fits well to the data obtained when varying amounts of immune-complex (in terms of serum or antigen) reacts with a constant amount of complement¹⁵ the determination of the serum or antigen titer can be done without conversion factors tables, avoiding the introduction of errors. In this case the immune-complex titer (in terms of serum or antigen) could be defined as the slope of the linear relationship between complement added and the amounts of immune-complex (in terms of serum or antigen):

$$T_S = \frac{\Delta C}{\Delta S} \quad T_A = \frac{\Delta C}{\Delta A}$$

where ΔS and ΔA are respectively the difference between the amounts of serum or the amounts of antigen, required for 50% hemolysis.

The computation of titer under these conditions differs from the method previously used¹⁶⁻²⁰:

$$T_S = \frac{\Delta K'_{S,A}}{\Delta S} \quad \text{and} \quad T_A = \frac{\Delta K'_{S,A}}{\Delta A}$$

where $K'_{S,A}$ is the amount of complement required for 50% hemolysis¹⁹.

The amounts of serum or antigen required for 50% hemolysis can be determined from the von Krogh's relation as:

$$\log F'_K = \log F - h'_F \log \left(\frac{y}{1-y} \right)$$

where F'_K is the amount of immune-complex (in terms of serum or antigen) required for 50% hemolysis; F is an amount of immune-complex in the tube with partial hemolysis, y .

When the logarithms of F are plotted against the logits of y the points fall in a straight line, with the slope h'_F . The determination of $\log F'_K$ can be done by graphic method and it corresponds to the ordinate value for the logit of 50% hemolysis.

The graphic method provides a test for the goodness of fit of the line representing the hemolytic curve, being a definite aid in cases of erratic data.

The logistic curve has been applied to other forms of bioassay^{3, 23} with different curve-fitting methods. The probit curve^{6, 8} has been used for bioassay involving hemolysis by complement²¹ and by bacterial lysis¹¹.

It has been shown²² that either curve, logistic or probit may be fitted to the other so well over the ranges usually employed in bioassay, that they cannot be distinguished from one other, being difficult to discriminate between them, on the basis of goodness of fit, as an argument in favor of either method. Even expert statisticians disagree on the choice of the method as GADDUM¹⁰, BLISS⁶, FINNEY⁸, IPSEN¹¹, BERKSON^{3, 6}, WAKSMAN²¹ and THOMPSON¹⁷.

The simplicity and the capacity to reproduce the observations with reasonable fidelity, should guide the biologist for the choice of the mathematical function. In these respects the logistic equation fulfills these requirements. It is simple, both in its functional form and in the number of parameters involved.

For the arithmetical computation of the parameters of the logistic curve, the least square method is employed. Two regression lines⁴ can be drawn, one minimizing the errors of F and the other minimizing the errors in hemolysis. Although the first line

has been used in complement titration¹², there is a definite convenience to draw the line, minimizing, the errors in hemolysis.

For easier computation and use of the least square method, with the logistic function, tables are presented, for reactions where the reagents (serum or antigen) are employed in logarithmic dilutions.

RESUMO

Sobre o uso da equação logística de von Krogh em reações de fixação de complemento quantitativas

As quantidades de complexo-imune necessárias para 50% de hemólise com uma dada quantidade de complemento pode ser determinada gráfica ou aritméticamente, a partir da relação linear entre os logaritmos dos volumes de sôro ou de antígeno e os logitos de hemólise. A equação logística de von Krogh deve ter preferência para a determinação dos parâmetros deste bioensaio, pelo método dos mínimos quadrados. As tabelas são apresentadas para facilitar o cálculo.

REFERENCES

1. ALMEIDA, J. O. — Isofixation curves as a method of standardizing complement-fixation tests. *J. Immunol.*, **76**:259-263, 1956.
2. ALMEIDA, J. O. & FREITAS, J. L. P. — Reações atípicas em fixação de complemento nos sistemas sífilis e doença de Chagas, pelo método quantitativo. *R. bras. Biol.*, **13**: 1-12, 1953.
3. BERKSON, J. — Application of the logistic function to bio-assay. *J. Amer. Statist. Ass.*, **39**:357-365, 1944.
4. BERKSON, J. — Are there two regressions? *Amer. Statist. Ass.*, **45**:164-180, 1950.
5. BERKSON, J. — Why I prefer logits to probits. *Biometrics*, **7**:327-339, 1951.
6. BLISS, C. I. — The method of probits-a correction. *Science*, **79**:409-410, 1934.
7. FIFE Jr., E. H. & MUSCHEL, L. H. — Influence of magnesium and calcium ions on the hemolytic activity and stability of guinea-pig complement. *J. Immunol.*, **87**:688-695, 1961.
8. FINNEY, J. D. — Probit analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. *Cambridge Univ. Press*. II ed., 1952.
9. FREITAS, J. L. P. & ALMEIDA, J. O. — Nova técnica de fixação de complemento para moléstia de Chagas. Reação quantitativa com antígeno gelificado de *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital*, **35**:787-800, 1949.
10. GADDUM, J. H. — Reports on biological standards. III. Methods of biological assay depending on a quantal response. *Spec. Rep. Ser. med. Res. Coun. (Lond.)*, **183**:1-46, 1933.
11. IPSEN, J. — Contribution to the theory of biological standardization. *Nyt Nordisk Forlag*, Arnold Busck, Copenhagen, 1941, 248 p.
12. KENT, J. F.; BUKANTS, S. C. & REIN, C. R. — Studies on complement fixation. I. Spectrophotometric titration of complement; construction of graphs for direct determination of the 50-per-cent hemolytic unit. *J. Immunol.*, **53**:37-50, 1946.
13. KROGH, M. von. — Colloidal chemistry and immunology. *J. infect. Dis.*, **19**:452-477, 1916.
14. MANWARING, W. H. — Hemolytic curves. *Zbl. Bakter.; I. Abt. Orig.*, **40**:400-405, 1906.
15. RAPPORTE, M. M. & GRAF, L. — Immunochemical analysis based on complement fixation. *Ann. Acad. Sci.*, **69**:608-632, 1957.
16. RICE, C. E. — Some factors influencing the selection of a complement fixation method. I. Comparison of two quantitative techniques, and an alternative method of expressing serum dilution titer. *J. Immunol.*, **59**:95-107, 1948.
17. THOMPSON, W. R. — On the use of parallel systems of transformed curves in bioassay: illustration in the quantitative complement fixation test. *Biometrics*, **4**:197-210, 1948.
18. THOMPSON, W. R. & MALTANER, F. — On the construction of graphs and tables for evaluation of the quantitative complement-fixation reactions and reaction ratios. *J. Immunol.*, **38**:147-157, 1940.
19. THOMPSON, W. R.; RICE, C. E.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — Some fundamental notions in estimation of complement-fixation. I. General relations and a proposed uniform notation. *J. Immunol.*, **62**:353-361, 1949.
20. WADSWORTH, A. B.; MALTANER, F. & MALTANER, E. — Quantitative studies of the reaction of complement fixation with tuberculous immune serum and antigen. *J. Immunol.*, **35**:93-103, 1938.
21. WAKSMAN, B. H. — A comparison of the von Krogh formula (logistic function) and the method of probits as applied to hemolysis by complement. *J. Immunol.*, **63**:409-414, 1949.
22. WINSOR, C. P. — A comparison of certain symmetrical growth curves. *J. Wash. Acad. Sci.*, **22**:73-84, 1932.
23. WORCESTER, J. & WILSON, E. B. — A table determining L. D. 50 or the fifth per cent endpoint. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **29**:207-212, 1943.

Recebido para publicação em 5/9/1971.

ECONOMICAL SYSTEM FOR THE IDENTIFICATION OF NON-FERMENTATIVE GRAM-NEGATIVE RODS: II. AN UPDATED, SIMPLIFIED ALTERNATIVE

Alexander von GRAEVENITZ⁽¹⁾ & Steven PANTELICK

S U M M A R Y

A system for the identification of non-fermentative Gram-negative rods is presented which uses nine routine tests (7 media); another seven tests are used on special occasions. The spectrum covers 34 bacilli. In most instances, a correct diagnosis can be made within 48 hours after isolation.

In an earlier publication, a system for the identification of non-fermentative Gram-negative rods (NFGNR), based on data available in 1970, was outlined by one of us¹⁰. It divided NFGNR in those growing on MacConkey Agar — the usual primary isolation medium next to blood agar — and those not growing on it; and used the oxidase test for a further subdivision. A minimum of 11 tests (9 media) was employed.

In the meantime, new data on NFGNR have become available to us, particularly on the following subjects: biochemistry of *Pseudomonas* species⁴, *Xanthomonas*⁶ (which would be difficult to speciate at the present time), and some unnamed taxa¹¹; antimicrobial sensitivity of *Actinobacillus mallei*⁵, *Alcaligenes* species^{3, 7}, *Bordetella bronchiseptica*³, and *Pseudomonas* species⁴. Furthermore, a substantial number of *Pseudomonas multivorans* (*P. cepacia*, *P. kingii*, EO-1¹¹) and *Xanthomonas* strains have been isolated in this laboratory and served to amplify and correct earlier data.

In order to accomodate these changes and additions, an updated version of the diagnostic system was developed. It also simplifies the procedure by using only 9 routine tests (7 media).

The system operates as follows:

Gram-negative rods are recognized as such by growth on MacConkey Agar* and/or a smear of the growth from blood agar. Since the ability to grow on MacConkey Agar does not seem to be an all-or-nothing phenomenon in certain species (*Xanthomonas*, *Moraxella*¹¹), we omitted its use as a differential characteristic.

Recognition is followed by inoculation of **Triple Sugar Iron Agar** (TSI)* which is incubated at 37°C for 24 hrs. NFGNR are diagnosed by their inability to grow in the butt; growth changes the slant often to pink, rarely to yellow (e.g., in *P. pseudomallei*), and sometimes leaves it unchanged. Our system includes only those NFGNR able to grow on TSI. After 24 hrs, the **Oxidase Reaction** is checked with tetramethylene — p — phenylenediamine dihydrochloride on filter paper (Kovacs). Development of a purple color within 60 seconds denotes a positive test⁹.

Furthermore, the following media are inoculated and incubated at 30°C (unless indicated otherwise) for 24 hrs or, if reactions are still negative, for a total of 48 hrs:

OF Basal Media open — with 1.0% glucose (Gluc), 1.0% xylose (Xyl), and 1.0% maltose (Mal). A control tube without sugar should be included;

(1) Section of Laboratory Medicine, Yale University School of Medicine; and Clinical Microbiology Laboratories, Yale-New Haven Hospital; New Haven, Connecticut — 06504 — (USA)

TABLE I

Identification of oxidase-positive NFGNR (polarly flagellated unless indicated otherwise)

Gluc OF	Xyl OF	Mal OF	Mot	NO ₃	Urea	Cl	Pig	Other	Diagnosis
A	A	A	+	G/(+)	-/+	R	w-b	Gel +	P. pseudomallei
	A	-/A	+	G	-/+	S	w-b	Gel —	F. stutzeri
	A/(-)	A	+	+/-	-/+	R	y/-	LD +, > 1 flag.	P. multivorans */**
	A	A	+	—	-/+	R/S	y	LD —, 1 flag.	Xanthomonas spp.*
	-/A	A/(-)	—	—	—	R	y	LD —, indol +	Flavobacterium spp.
	A	A/(-)	+	+/-	+	(a)	—		Pseudomonas IV-d()
	A	A/-	+	G	+	(a)	—		Pseudomonas V-a()
	A	A/-	+	G	+	(a)	—	peritrichous	Achromobacter V-d()
	A	-/(A)	+	-/(+)(-)	+/-	S	F	Gel +	P. fluorescens
	A	-/(A)	+	—	-/+	S	F	Gel —	P. putida
	A	—	+	G/(-)	+/-	S	any	Gel +/-(-)	P. aeruginosa
	—	A ^D /-	—	+	—	R	—		Actinobacillus mallei
A/-	—	-/(A)	+	+	+/-	S	t	H ₂ S in TSI +, DNase +	P. putrefaciens (I-b)
	A	—	+	+	—	(a)	—	peritrichous	Achromobacter III-a()
	A	—	+	G	—	(a)	—	peritrichous	Achromobacter III-b()
	—	—	+	+	—	S/R	—	PD +/-, Fruc A, 1 flag	P. pseudoalcaligenes
	—	—	+	+	—	S/R	—	PD -, Fruc A/> 1 flag,	P. acidovorans-testosteroni**
	—	—	+	+	—	S	—	PD +, Fruc -, 1 flag.	P. alcaligenes
	—	—	+	+/-	—	R	t	DNase +	P. diminuta
	—	—	+	-/+	—	S/R	—	peritrichous	Alcaligenes faecalis
	—	—	+	—	—	S	—	" odor	A. odorans
	—	—	+	G	—	S	—	"	A. denitrificans
	—	—	+	—	+	(a)	—	"	Alcatigenes IV-c()
	—	—	+	+	+	S/R	—	"	Bordet. bronchisept.
	—	—	—	+/(+)	+	S	—	diplobacilli	Moraxella phenylpyruvica
	—	—	—	—	—	S	—	"	M. osloensis
	—	—	—	+	—	S	—	"	M. nonliquefaciens
	—	—	—	—	—	(a)	t	indol +	II-f()
	—	—	—	—	+	(a)	t	indol +	II-j()

* oxidase reaction may only be weakly + and appear after 10 sec.

** probably identical with *Comamonas terrigena*

*** Pigment may appear on TSI only

Trypticase Nitrate Broth* for nitrate (NO₃) reduction and motivity (Mot hanging drop) tests; * Bioquest, Cockeysville, Md.

Urea Agar Base* (Christensen), which gives more diagnostically important positive reactions than the previously used Urease Test Broth * of Rustigian and Stuart;

Mueller-Hilton Agar* with a Kirby-Bauer¹ sensitivity test setup which includes a 10 µg colistin (Cl) disc*. Resistance to colistin is indicated by a diameter of disc

plus inhibition zone of less than 9 mm, after 24 hrs incubation at 37°C. Pigment formation is also best seen on this medium.

Occasionally, the following tests or media are added:

1. Gelatin Liquefaction (Gel), using 12.5% gelatin* in an extract or infusion broth;

2. OF Basal Medium* with 1.0% fructose (Fruc) — open tube —;

3. Deoxyribonuclease (DNase), using DNase Test Agar * with 0.01% toluidine blue⁸;

4. Indol, using Trypticase^{*} with Ehrlich's or Kovacs' reagent;

5. Lysine Decarboxylase (LD), using Lysine Decarboxylase Tablets **, 40.0% KOH and 1.0ml of ninhydrin;

6. Phenylalanine deaminase (PD), using PathoTec PD Test Strips ***;

7. Flagellar stain (any method).

Tests 1 — 4 are incubated for 24 to 48 hrs at 37°C, while tests 5-7 can be read within 4 hrs.

Since the purpose of this system is diagnostic and not taxonomic, certain tests considered important for the characterization of NFGNR (e.g., amylase, 10.0% lactose oxidation, arginine dihydrolase, bethaydroxybutyric acid accumulation) have been omitted. In our experience, most NFGNR will be diagnosed with the help of the system within 48 hrs after isolation.

TABLE III

Identification of oxidase-negative NFGNR

Gluc OF	Xyl OF	Mal OF	Mot	NO ₂	Urea	Cl	Pig	Other	Diagnosis
A	A/(-) A	A A	+	+/- —	-/+ -/+	R R/S	y/- y	LD +, > 1 flag. LD —, 1 flag.	P. multivorans*** Xanthomonas spp.)
	A	—	—	—	+/-	S	—	diplobacilli	A. anitratus (Herellea) +)
	—	A ^D /-	—	+	—	R	—		Actinob. mallei
↓	A ^D /- -/(A)	A	+	+/-	—	S/R	t/-	DNase +	F. maltophilia
—	—	—	—	—	+	S	t		Bordet. parapertuss.
↓	—	—	—	—	+/-	S/(R)	—	diplobacilli	A. Iwoffii (Mima polymorpha) +)

+) The subdivision of the new genus *Acinetobacter* into proteolytic and glucolytic species² was not taken into consideration in this scheme

Abbreviations and Symbols used in Tables.

+, positive; or: formation of nitrite
/, or (reaction of majority of strains listed first)
—, negative
(), occasional strain
A, acid
(a), no data available as of now
b, buff
D, delayed

F, fluorescein
flag, flagellum
G, gas
R, resistant
S, sensitive
t, tan
w, white
y, yellow

Other abbreviations are explained in the text.

RESUMO

Sistema econômico para a identificação de bastonetes Gram-negativos não fermentativos:
II. Uma alternativa simplificada e atual.

Propõe-se um sistema de identificação de bastonetes Gram-negativos não fermentativos,

utilizando-se para o propósito, 9 testes de rotina em 7 meios de cultura. Sete testes adicionais são utilizados em circunstâncias especiais. O esquema abrange 34 microrganismos. Na maioria dos casos, o diagnóstico correto pode ser atingido dentro de 48 horas após o isolamento.

* Bioquest, Cockeysville, Md.

** Key Scientific Products, Los Angeles, Calif. (see directions)

*** Warner-Chilcott Laboratories, Morris Plains, N.J.

R E F E R E N C E S

1. BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. & TURCK, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. J. clin. Path.*, **45**:303-496, 1966.
2. BAUMANN, P.; DOUDOROFF, M. & STANIER, R. Y. — A study of the *Moraxella* group. II. Oxidase-negative species (Genus *Acinetobacter*). *J. Bact.*, **95**:1520-1541, 1968.
3. GARDNER, P.; GRIFFIN, W. B.; SWARTZ, M. N. & KANZ, L. J. — Nonfermentative Gram-negative bacilli of nosocomial interest. *Amer. J. Med.*, **48**:735-749, 1970.
4. GILARDI, G. M. — Characterization of *Pseudomonas* species isolated from clinical specimens. *Appl. Microbiol.*, **21**:414-419, 1971.
5. MANNHEIM, W. & BUERGER, H. — Ueber physiologische Merkmale und die Frage der systematischen Stellung des Rotz-Erregers. *Z. med. Mikrobiol. Immunol.*, **152**:249-261, 1966.
6. PICKETT, M. J. & PEDERSEN, M. M. — Characterization of saccharolytic nonfer-
- mentative bacteria associated with man. *Canad. J. Microbiol.*, **16**:351-362, 1970.
7. PICKETT, M. J. & PEDERSEN, M. M. — Salient features of nonsaccharolytic and weakly saccharolytic non-fermentative rods. *Canad. J. Microbiol.*, **16**:401-409, 1970.
8. SCHREIER, J. C. — Modification of DNase Test Medium for rapid identification of *Serratia marcescens*. *Amer. J. clin. Path.*, **51**:711-716, 1969.
9. STEEL, K. J. — The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. gen. Microbiol.*, **25**:297-306, 1961.
10. VON GRAEVENITZ, A. — Economical system for the identification of non-fermentative Gram-negative rods. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **37**:201-208, 1971.
11. WEAVER, R. G. — Supplements to E. O. King: The identification of unusual pathogenic Gram-negative bacteria (1964). Center for Disease Control, Atlanta, Ga., 1970 and 1971.

Recebido para publicação em 15/8/1971.

UMA TERCEIRA ESPÉCIE DE ACTINOMYCETALES DO GÊNERO *ELYTROSPORANGIUM*, *E. CARPINENSE* SP. NOV., ISOLADA DE SOLO EM PERNAMBUCO

José Otamar Falcão de MORAIS⁽¹⁾, José Oliveira da SILVA⁽¹⁾ & Clélio MACHADO⁽¹⁾

R E S U M O

Através de um estudo comparativo direto das culturas-tipo das espécie de *Elytrosporangium* até agora descritas, a saber *E. brasiliense* ATCC 23727 e *E. spirale* ATCC 25664 com uma cultura recentemente isolada, n.º 70-6-2, os Autores chegam à conclusão de que a última pode ser diferenciada das duas primeiras, devendo, por isso, ser considerada como espécie nova. A característica distintiva mais importante da nova espécie é a coloração marrom-negra apresentada pelo reverso do desenvolvimento, após a primeira semana de cultivo, na maioria dos meios comumente empregados.

Por ter sido isolada de amostra de solo colhida em Carpina, Pernambuco, a espécie recebe o nome de *Elytrosporangium carpinense* sp. nov. Cultura-tipo: Amostra 70-6-2 do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

I N T R O D U C Ã O

O gênero *Elytrosporangium* foi descrito em 1966, por FALCÃO DE MORAIS & col.³ para enquadrar uma cultura de actinomiceto semelhante as do gênero *Streptomyces*, tendo porém uma característica particular: produzia no micélio vegetativo, estruturas em forma de vagens (merosporângios) contendo no seu interior uma cadeia de esporos imóveis. Em 1963 CROSS & col.² e TSYGANOV & col.⁸ haviam, respectivamente, sob a denominação de *Microellobosporia* e de *Macrospora* descrito culturas também produtoras de merosporângios, porém apresentando um micélio aéreo estéril. Os gêneros *Elytrosporangium* e *Microellobosporia* foram, pelos seus respectivos descobridores, incluídos na família *Actinoplanaceae* Couch. Entretanto, considerando fatores como natureza química da parede celular, sensibilidade a fagos, aspectos macroscópicos das culturas, etc., todos comuns aos gêneros *Microellobosporia* (*Macrospora*) e *Elytrosporangium* por um lado e *Streptomyces* e demais gêneros da família

Streptomycetaceae, por outro, PRAUSER & col.⁶ propuseram que as culturas produtoras de merosporângios fossem incluídas na família *Streptomycetaceae*. Em trabalho anterior, um dos autores⁴ já havia chamado a atenção para as relações existentes entre *Elytrosporangium*, *Microellobosporia* e *Streptomyces*, sugerindo que o gênero *Elytrosporangium* talvez seja o tronco natural de que derivariam os outros dois gêneros.

Duas espécies de *Elytrosporangium* foram descritas: *E. brasiliense*³ e *E. spirale*⁵. A essas duas se junta agora uma terceira (salvo alguma publicação de que os autores não têm, no momento conhecimento), isolada de solo cultivado do município de Carpina, Pernambuco, que é o objeto deste artigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento — A amostra de solo (terreno cultivado com *Manihot utilissima* L.), colhida a uns 10 cm da superfície, foi suspensa e diluída em água estéril. O isolamento

Trabalho apresentado por ocasião do III Congresso Brasileiro de Microbiologia, Belo Horizonte, julho, 1971

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

mento foi feito por diluição em placas, usando-se meio de agar Czapek. As placas foram incubadas por 7 a 10 dias a 30°C.

Cultura — A cultura estudada tinha por sigla 70-6-2. Seu estudo para fins taxonômicos foi iniciado logo após o isolamento.

Meios de cultura — Foram usados os meios de rotina para estudo de actinomictos.

Métodos — Os métodos seguidos são os indicados para estudo de *Streptomyces*⁷, salvo ligeiras modificações.

R E S U L T A D O S

Descrição de *Elytrosporangium carpinense*
FALCÃO DE MORAIS, OLIVEIRA DA SILVA e
MACHADO, s. nov.

Obs.: Os resultados aqui apresentados se baseiam numa comparação direta, da cultura 70-6-2 com as culturas tipo das duas espécies anteriormente descritas.

Micélio vegetativo — Hifas com cerca de 1 μ de diâmetro; longas, ramificadas. Colônias duras, secas, como as de *Streptomyces*, sendo inicialmente incolores ou creme, em todos os meios; após a primeira semana de cultivo passam a verde-azeitona (aveia agar, asparagina-glicerol agar, por exemplo) ou amarelo-esverdeado (Czapek).

Merosporângios — Abundantemente produzidos, já ao 8.^º dia de cultivo, em numerosos substratos gelosados, especialmente em malte-extrato de levedura, aveia e asparagina-glicerol. Contêm, na maioria, em torno de 5 esporos, podendo conter às vezes até 10 ou mais. A exemplo das duas espécies antes descritas os merosporângios são vistos apenas no micélio vegetativo.

Micélio aéreo — Cadeias de conídios globosos, ou sub-globosos, espiraladas. A cor do micélio aéreo, entre 14 e 21 dias de cultivo é cinza clara com uma tonalidade marrom, ou cinza escura, conforme o meio.

Características de cultivo e bioquímicas:

Extrato de levedura-extrato de malte agar (Meio ISP-2, Difco) — Crescimento inicial (vegetativo) incolor. Micélio aéreo cinza escuro aos 14 dias. Reverso (14 dias) marrom-castanho quase negro. Pigmento solúvel não formado. Hifas aéreas férteis, S e RA. Pigmento solúvel ausente.

Agar aveia (ISP-3, Difco) — Crescimento inicial incolor, passando depois a ter uma coloração castanha escura, quase negra (reverso). Micélio aéreo cinza, com hifas aéreas férteis, S e RA. Pigmento solúvel ausente. Merosporângios numerosos.

Amido agar (ISP-4, Difco) — Crescimento inicial incolor, passando a verde na base da inclinação (tubos). Micélio aéreo cinza. Reverso castanho a quase negro. Hifas aéreas S, férteis. Merosporângios numerosos. Pigmento solúvel não produzido.

Asparagina-glicerol agar (ISP-5, Difco) — Crescimento de início incolor, passando, após o 7.^º dia de cultivo, a verde-azeitona. Micélio aéreo cinza escuro aos 14 dias. O reverso aos 14 dias é marrom-negro. Pigmento solúvel não formado. Merosporângios numerosos.

Tirosina-agar (ISP-7, Difco) — Crescimento inicial incolor, precocemente recoberto com micélio aéreo branco. Este passa, já nos 7 dias, a ter uma coloração cinza escura. Reverso, aos 14 dias, castanho-negro. Pigmento solúvel ausente.

Agar glicose — Desenvolvimento branco-acinzentado. Micélio aéreo escasso (só nas margens das estriás), cinza-lavanda. Reverso creme esverdeado. Pigmento solúvel ausente. Micélio vegetativo — fragmentação considerável; ausência de merosporângios.

Agar Czapek — Desenvolvimento inicial incolor, passando ao 7.^º dia de cultivo a amarelo esverdeado no terço inferior da estria (em tubos). Em placas é incolor e amarelo esverdeado (nas extremidades das estriás). Reverso castanho ou esverdeado correspondentemente. Micélio aéreo muito ralo, cinza claro. Pigmento solúvel ausente.

Redução de nitrato a nitrito — Positiva.

Hidrólise de amido — Positiva (10 mm a 10.^º dia de incubação), moderada.

Leite tornassolado (Oxoid) — Peptonização total ao 14.^º dia. Crescimento em anel, castanho escuro.

Gelatina-peptona (Oxoid) — Anel creme-amarelado. Peptonização total aos 14 dias. Pigmento solúvel não produzido.

Melanina — Não produzida (ISP-6 e ISP-7, Difco; Gelatina peptona, Oxoid).

Utilização de compostos de carbono (meio básico ISP-9, Difco) — Resultado positivo para L-arabinose, D-frutose, ramnose, D-xilose, L-inositol, rafinose, manitol, lactose e salicina. Resultado negativo para sacarose. Celulose (solução de Czapek sem sacarose, com fitas de papel de filtro): ausência de desenvolvimento.

Atividade antagonista — Não detectada, em estriás cruzadas e em meios líquidos, para bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Temperatura de crescimento — A amostra desenvolve-se bem entre 25 e 40°C,

com ótimo entre 35 e 37°C. A 45°C o crescimento já se revela muito fraco. (Meios ISP-2 e ISP-5, Difco; incubação em ambiente seco, exceto no que se refere a 45°C que foi feita em banho d'água).

Cultura-tipo — Amostra 70-6-2 do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco.

C O N C L U S Ã O

Pelas características de cultivo a amostra pode ser distinguida com facilidade das duas espécies de *Elytrosporangium* antes descritas: *E. brasiliense* e *E. spirale*. Seu traço mais típico é a coloração quase negra apresentada pelo reverso das colônias, após a primeira semana de incubação, em quase todos os meios de cultivo. (Tabela I).

T A B L E I

Principais diferenças entre *Elytrosporangium carpinense* sp. nov. e as duas espécies anteriormente descritas

	<i>E. carpinense</i> sp. nov.	<i>E. brasiliense</i> ATCC 23727	<i>E. spirale</i> ATCC 25664
Agar glicose	D: branco-acinzentado M.a. escasso (nas margens das estrias), cinza-lavanda, R= creme esverdeado, P.s.a. M.v.= Fragmentação	—	D= creme, M.a.= cinza claro, R= castanho-amarelado, P.s.=amarelo claro.
Agar extrato de malte — extrato de levedura (ISP-2)	D.i.i. M.a.= Cinza escuro aos 14 dias. R.= (14 dias) marrom quase negro. P.s.a.	D= incolor a castanho. M.a.= cinza azulado claro R= castanho. P.s.a.	D= castanho R= castanho M.a.= cinza-marrom
Agar aveia (ISP-3)	D.i.i. passando a castanho escuro. R= quase negro. M.a.= cinza. P.s.a.	D= incolor R= incolor M.a.= escasso, cinza-azulado. P.s.a.	D= incolor a creme, passando a castanho claro, M.a.= cinza claro. R= castanho claro. P.s.a.
Agar amido (ISP-4)	D.i.i. passando a verde na base da inclinação (tubos). R.= castanho a quase negro M.a.= cinza. P.s.a.	D= incolor M.a.= branco-acinzentado. R= incolor a creme amarelado P.s.a.	D= incolor a creme R= castanho-amarelado M.a.= cinza-branco P.s.a.
Agar-asparagina-glicerol (ISP-7)	D.i.i. passando a verde-azeitona. M.a.= cinza escuro R= marrom-negro P.s.a.	D= incolor a creme. R= incolor. M.a.= ausente ou escasso, branco. R= incolor P.s.a.	—
Agar-Tirosina (ISP-7)	M.a. precoce, cinza escuro. R= castanho negro. P.s.a.	M.a.= cinza claro azulado. R= castanho a marrom claro P.s.a.	—
Agar Czapek	D.i.i. passando a amarelo-esverdeado. R=castanho a esverdeado. M.a. cinza claro. P.s.a.	D= incolor a cõr de chumbo. M.a. não produzido. R= incolor a creme. P.s.a.	D= raso, incolor a cinza-esverdeado. R= incolor. P.s.a.
Salicina Sacarose	Positiva Negativa	Negativa Negativa	Negativa Positiva

D = Desenvolvimento, crescimento

M.a.= Micélio aéreo

R = Reverso do desenvolvimento

P.S. = Pigmento solúvel

D.i.i. = Desenvolvimento inicial incolor

M.a.c. = Micélio aéreo cinza

P.s.a. = Pigmento solúvel ausente

M.v. = Micélio vegetativo

SUMMARY

A third species of Actinomycetales of the genus Elytrosporangium, E. carpinense sp. nov. isolated from soil in Pernambuco, Brazil

A direct, comparative study of the cultures 70-6-2 (*E. carpinense* sp. nov.), *E. brasiliense* 2572 (ATCC n.^o 23727) and *E. spirale* C9A (ATCC n.^o 25664) showed that the culture 70-6-2 may be easily distinguished from the two other, being, no doubt, a new species of the genus.

The main distinctive character of the new species is the almost black color of the reverse side of the growth it produces in several culture media. Other characteristics of *E. carpinense* sp. nov. are: 1 — dark gray aerial mycelium, 2 — S and RA spore chains morphology, 3 — abundant production of merosporangia on several media, and 4 — positive utilization of salycin and negative one of sucrose.

Type culture: 70-6-2 of the "Laboratório de Micribiologia do Instituto de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco".

REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BECKER, B.; LECHEVALIER, M. P. & LECHEVALIER, H. A. — Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.* **13**:236-243, 1965.
2. CROSS, T.; LECHEVALIER, M. P. & LECHEVALIER, H. A. — A new genus of the Actinomycetales: *Microellobosporia* gen. nov. *J. gen. Microbiol.*, **31**:421-429, 1963.
3. FALCÃO DE MORAIS, J. O.; CHAVES BATISTA, A. & MASSA, D. M. G. — *Elytrosporangium*: A new genus of the Actinomycetales. *Mycopathologia (Den Haag)*, **30**:161-171, 1966.
4. FALCAO DE MORAIS, J. O. — On the genus *Elytrosporangium* and its relationship to *Microellobosporia* and *Streptomyces*. *Hindust. Antibiot. Bull.*, **9**:135-137, 1967.
5. FALCAO DE MORAIS, J. O. — *Elytrosporangium spirale*: Nova espécie de *Actinoplanaceae* do gênero *Elytrosporangium*. *Rev. Microbiol.* **1**(2):79-84, 1970.
6. PRAUSER, H.; MULLER, L. & FALTA, R. — On the taxonomic position of the genus *Microellobosporia*. *Int. J. system. Bact.* **17**: 361-366, 1967.
7. SHIRLING, E. B. & GOTTLIEB, D. — Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. system. Bact.*, **16**:313-340, 1966.
8. TSYGANOV, V. A.; JUKOVA, R. A. & TIMOFEEVA, K. A. — A new genus of actinomycetes, *Macrospora* gen. nov. (em russo). Simpósio científico do Inst. de Antibióticos de Leningrado, 3.^a, Leningrado, 1963. (Apud Becker, B. & Col., 1965, *op. cit.*).

Recebido para publicação em 13/10/1971.

ISOLATION OF ARIZONA FROM HUMAN ENTERIC INFECTIONS

Maria Iêda SIQUEIRA ⁽¹⁾ & Marcelo MAGALHÃES ⁽¹⁾

S U M M A R Y

Out of 1200 faecal routine cultures it was isolated 25 *Arizona* strains. The high incidence of recovery was thought to be due to the systematic transference of fermenting lactose colonies to the screening medium and further serologic and biochemical studies of all cultures urease negative and H2S positives.

Although *arizona* seem to have a pathogenic potential similar to that observed in the *salmonella* organisms, only occasionally they are isolated from human sources. Probably, this occurs because some *arizona* strains ferment lactose promptly upon selective enteric media and thus their colonies can be mistaken for those of coliform. This eventuality was kept in mind during this survey that studies the frequency of *Arizona* among human enteric cultures at diagnostic laboratory routine work.

A total of 1200 fecal specimens sent to laboratory for isolation of pathogenic enteric bacteria were plated on EMB-Agar, SS-Agar and Brilliant Green Agar (Difco), directly and after enrichment in Kauffmann's

Tetrathionate Broth. Two colonies of each kind, lactose fermenting and non fermenting, were picked out from the plates and transferred to a double phase screening medium composed of a butt indicative of motility and urease production and a slant of TSI-Agar. All the cultures non urea splitting and H2S producers were tried through slide agglutination against anti-*Salmonella*, anti-*Arizona* and anti-*Citrobacter* polyvalent sera (Difco). The positive cultures in *Arizona* serum were submitted to the following biochemical tests: indol, KCN, gelatin, malonate, citrate, lisine, lactose, sucrose and dulcitol (KAUFFMANN, F. — The bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, 1966).

T A B L E I
Biochemical characteristics of the 25 isolates

Strain Test	1-10	11-12	13	14-15	16-18	19-20	21-22	23	24	25
Indol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
KCN	—	—	+	—	—	—	—	—	—	—
Gelatin	+	—	+	+	+	—	+	—	+	+
Lisine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonate	+	+	+	—	—	+	—	—	+	—
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	—	—	+	—	—	—	+	+	—	+
Dulcitol	—	—	—	—	+	+	—	—	+	+

(1) Departamento de Microbiologia; Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco — Cidade Universitária — Recife, Pernambuco — Brasil

In this way it was possible to select 25 cultures (2.0%) that had agglutinated strongly in *Arizona* poly serum. Ten of these showed a typical biochemical pattern similar to that presented by the *Arizona* group in accordance to Ewing's identification tables (EWING, W. H. et al. — *J. Infect. Dis.*, **119**: 197-213, 1969). The left 15 strains showed somewhat aberrant results in the battery of tests (Table I). Thus, it would be good to performe more extensive biochemical and serologic studies before deciding, with certainty, if the atypical isolates are, in reality, *Arizona*.

The incidence of typical and probable *Arizona*, presently observed, was higher than that previously described on other paper BHAT, P. et al. — *Indian J. Med. Res.*, **57**:1240-1245, 1959) and might be attributed to the careful transference of coliform-like

colonies to the screening medium and further serologic and biochemical studies of all suspect cultures. About 70.0% of our arizona strains were able to attack lactose within 24 hours.

R E S U M O

Isolamento de Arizona de infecções intestinais humanas

De 1200 coproculturas rotineiras isolaram-se 25 amostras de *Arizona*. Atribuiu-se o sucesso dos isolamentos à repicagem sistemática de colônias fermentadoras da lactose para o meio de triagem e ao ulterior estudo sorológico e bioquímico das culturas produtoras de H₂S e urease negativas.

Recebido para publicação em 8/12/1971.

EDITORIAL	Pág.
Ensino da Microbiologia — PAULO DE GÓES	1
 ARTIGOS ORIGINAIS	
Isolamento e caracterização de <i>Actinomycetes viscosus</i> do sulco gengival humano — L. C. BIER & W. C. de ARAUJO	3
The behaviour of cellulase in soil — A. DROZDOWICZ	17
Níveis de sensibilidade "in vitro" de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> à gentamicina e outros aminoglicosídeos — P. P. GONTIJO F., M. N. de ARÊDE & I. SUASSUNA	25
Comparação do meio de Rappaport e do meio de tetratônato de Kauffmann, em diversos esquemas para isolamento de <i>Salmonella</i> . Isolamento eventual de <i>Shigella</i> — D. P. FALCÃO & SUASSUNA	29
Meio líquido seletivo contendo vancomicina e colistina para o isolamento e anti- biograma do <i>Mycobacterium tuberculosis</i> — M. MAGALHÃES, G. CAMPOS & T. GUERRA	37
 REVISÃO	
Os herbicidas e os microrganismos — A. DROZDOWICZ	43

EDITORIAL	Pág.
O que é um microbiologista? — P. de GÓES	63
 ARTIGOS ORIGINAIS	
Pesquisa da tetratônato-redutase (TTR) em culturas de <i>Salmonella typhi</i> — E. HOFER & Y. P. S. da SILVA	65
Contaminação do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo <i>Clostridium tetani</i> . II. Avaliação da ocorrência estacional do bacilo do tétano no solo — W. TAVARES, R. A. SEBA & J. R. COURAS	69
Freqüência e identificação do <i>Haemophilus vaginalis</i> isolado de vaginites — M. MAGALHÃES & A. VÉRAS	73
The influence of oxygen on the resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to strepto- mycin — S. A. C. CAMBA, F. ALTERTHUM & L. P. de CARVALHO LIMA	79
Anti-rabies revaccination in humans. I. Effect of different schedules on individuals previously vaccinated with 14 or more doses — O. A. C. PEREIRA, N. COUTINHO, T. RAPHAELIAN & A. GODANO	83
A comparison between the Löwenstein-Jensen and American Trudeau Society culture media for isolation of tubercle bacilli in pathological specimens negative to microscopic examination — E. WAISBICH, L. R. V. FERNANDES & A. L. R. ROSSI	87
Resistência do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , "in vitro", à anfotericina B — A. L. CASTRILLON & P. S. MINAMI	93
 REVISÃO	
Biosynthesis of the side chain portion of <i>Salmonella typhimurium</i> "O" antigen T. HIGUCHI	97

ARTIGOS ORIGINAIS

Pág.

Definición de los hábitos alimentares de anofelinos de Guatemala y República Dominicana, por técnicas 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. ASSUMPCÃO, 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
---	-----

EDITORIAL

Pág.

A educação para a pesquisa — I. SUASSUNA	163
--	-----

ARTIGOS ORIGINAIS

Studies on enteric bacteria in the lower Amazon Region: II. <i>Salmonella</i> types isolated from wild reptiles in Pará State, Brazil — Z. C. Lins	165
Sobre um novo teste "in vivo" da ação protetora de antimicrobianos em caramundongos. — Tentativa preliminar de avaliação comparativa entre cloranfenicol, ampicilina e hetacilina — E. de Azevedo e Silva, F. J. G. Coutinho, I. M. de Morais & E. A. Maciel	171
Inhibition of <i>Crithidia fasciculata</i> by ethidium: Temperature and adenine effects — A. C. Manaia & I. Roitman	177
Cutaneous streptothricosis in brazilian cattle — O. Fischman, M. A. S. C. Portugal & I. G. Arantes	181
Protective effect of <i>Leptomonas pessoai</i> against the infection of mice by <i>Trypanosoma cruzi</i> — M. C. M. Souza & I. Roitman	187
On the use of von Krogh's logistic equation in the quantitative complement fixation test — J. O. de Almeida	191
Economical system for the identification of non-fermentative Gram-negative rods: II. An updated, simplified alternative — A. von Graevenitz & S. Pantelick	199
Uma terceira espécie de <i>Actinomycetales</i> do gênero <i>Elytrosporangium</i> , <i>E. carpinense</i> sp. nov., isolada de solo em Pernambuco — J. O. Falcão de Morais, J. O. da Silva & C. Machado	203

NOTA

Isolation of <i>Arizona</i> from human enteric infections — M. I. Siqueira & M. Magalhães	207
---	-----