

XVII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE HIGIENE

Realizar-se-á em Salvador, Bahia, de 8 a 14 de dezembro de 1968. Será o seguinte o temário:

- I — Epidemiologia, profilaxia e pesquisa das doenças transmissíveis, degenerativas, ocupacionais, mentais, das carências nutricionais e dos acidentes em geral.
- II — Organização e administração sanitárias, compreendendo bioestatística, planejamento, avaliação, financiamento, integração, formação de técnicos e auxiliares, educação e informação sanitárias.
- III — Higiene Industrial e saneamento do meio.
- IV — Ensino da Higiene, Medicina Preventiva e do Trabalho.

Haverá sessões de Temas Livres, nos quais serão classificados os trabalhos que não se enquadrem no temário oficial.

Os trabalhos de preferência envolvendo questões, problemas e sugestões de ordem prática aplicáveis ao Brasil, deverão conter resumo e conclusões e no frontispício o tema ao qual concorrem; devem ser remetidos ao Dr. José Duarte de Araújo, Secretário de Saúde Pública do Estado da Bahia.

RENDIMENTO DOS MEIOS SELETIVOS PARA BACTÉRIAS DO GÊNERO FUSOBACTERIUM *

Wilson C. de Araujo **, Maria Raquel dos Santos *** e Paulo Freitas ****

Meios seletivos para Fusobacterium foram comparados no aspecto de sua eficiência no isolamento dos microrganismos fusiformes e quanto à inibição da flora concomitante. Material não calcificado do sulco gengival foi homogeneizado e diluído em tampão de fosfato (0,067 M — pH 7,2); 0,1 ml foi semeado em agar sangue, no meio de Omata & Disraely, meio de Omata & Disraely sem soro, meio de McCarthy & Snyder, agar sangue com vancomicina, meio de Onisi, meio de Onisi com soro de cavalo e meio de Onisi com pH 7,0. Em todos os casos a incubação foi realizada em anaerobiose, em jarra tipo Brewer, com 95% nitrogênio e 5% gás carbônico, durante 4 dias.

O meio de McCarthy & Snyder mostrou-se tão eficiente quanto o agar sangue em relação ao isolamento de Fusobacterium, ainda inibindo a flora concomitante. O meio de Omata & Disraely, com cristal violeta e estreptomina, foi de certo modo inibidor também para Fusobacterium. O meio de Onisi, sugerido, sem soro, possibilitou o isolamento de pequeno número de fusobactérias, provavelmente as amostras não exigentes de proteínas naturais.

Microrganismos fusiformes, do gênero *Fusobacterium*, são encontrados na placa dental, sulco gengival e nas tonsilas como componentes da flora anfibiótica ou normal do hospedeiro.

Entretanto, a literatura relata a presença destes microrganismos em quadros patológicos da boca e outras áreas do organismo. Vincent (15) isolou fusobactéria de lesões ulcerativas e necróticas da garganta, da gangrena hospitalar (Pourriture d'Hospital). Veillon & Zuber, (14) examinando casos de gangrena pulmonar, bartolinite, otite e apendicite, caracterizados pelo odor pútrido do exsudato, encontraram microrganismos fusiformes somente nos casos de apendicite. Smith (12) isolou o microrganismo de casos de úlcera tropical e de 94% dos casos de abscesso pulmonar. Rosenow e Tuncliff (11) rela-

taram um caso de piemia do qual isolaram fusobactéria de várias lesões cutâneas apresentadas pelo paciente. Dick (5) relatou minuciosamente três casos de meningite dos quais isolou, *post-mortem*, microrganismos fusiformes. Vários autores isolaram fusobactéria de quadros de septicemia, como Brocard & Daum (2), Williams (16), Brocard et cols. (3) e Tynes & Utz (13).

Os microrganismos do gênero *Fusobacterium*, a partir do trabalho de Pratt (9) têm sido isolados com mais facilidade em meios nutritivos com sangue ou soro, e adicionados de corantes como o verde brilhante, violeta de genciana, verde de malaquita, etil violeta, cristal violeta, etc., conforme ressalta a detalhada revisão realizada por Böe (1), em 1941.

* Trabalho realizado com auxílio do Conselho de Pesquisas da U.F.R.J.

** Laboratório de Microbiologia Oral, Instituto de Microbiologia da U.F.R.J. — Professor Adjunto e Docente Livre da U.F.R.J.

*** Professor Assistente da F.O. da U.F. R.G. Norte. Bolsista da CAPES

**** Professor Assistente da F.O. da U.F.R.G. Sul. Bolsista da CAPES

Posteriormente, outros meios seletivos foram recomendados por Omata & Disraely (7) e por MacCarthy & Snyder (6) os quais empregaram, como substâncias impiedentes da flora de associação, cristal violeta-estreptomocina e estreptomocina-vancomicina, respectivamente. Ao contrário das observações mais comuns sobre as condições de isolamento de *Fusobacterium*, Onisi (8) recomendou um meio seletivo sólido, sem proteínas naturais, com pH 8,0, adicionado de azida sódica e cristal violeta como substâncias impiedentes.

Com a finalidade de comparar o rendimento dos diversos meios seletivos propostos para isolamento de *Fusobacterium* foi realizado o presente trabalho, no qual é analisado o isolamento de bactérias do gênero *Fusobacterium* como também a eficiência de sua inibição sobre a flora con-comitante.

MATERIAL E MÉTODOS

De pacientes adultos, com e sem doença periodontal, foi colhido material não calcificado de sulco gengival, com auxílio de curetas periodontais esterilizadas. O material foi pesado sobre uma secção de papel aluminizado estéril, de tara previamente determinada. Em tampão de fosfato (0.067 M, pH 7,2), o material foi dispersado em homogeneizador de tecido (Arthur Thomas, Philadelphia), com vinte manipulações do pistilo. Em todos os casos foi guardada a proporção 1 mg de material para 10 ml do diluente (diluição inicial 10-4); ainda no tampão do fosfato foram realizadas diluições decimais, espalhando-se 0,1 ml de cada, na superfície dos seguintes meios nutritivos:

1. AGAR SANGUE

peptona (Difco) 1%
extrato de carne (Difco) 0,3%
extrato de levedura (BBL) 0,3%
cloreto de sódio (Fisher) 0,5%
agar (Difco) 1,5%
sangue desfibrinado de coelho 5%

2. MEIO DE OMATA & DISRAELY

casitone (Difco) 1,5%
extrato de levedura (BBL) 0,5%

glicose (Coleman & Bell) 0,5%
cloreto de sódio (Fisher) 0,5%
1-cistina (Pfanstiehl) 0,075%
cristal violeta (Allied Ch.) 0,001%
sulfato de estreptomocina (Lilly) 0,001%
agar (Difco) 1,5%
sêro de cavalo 5%
pH 7,2

3. MEIO DE OMATA & DISRAELY

sem sêro de cavalo

4. MEIO DE ONISI

polipeptona (BBL) 1%
extrato de carne (Difco) 1%
glicose (Coleman & Bell) 1%
1-cistina (Pfanstiehl) 0,05%
gluconato de sódio (N.B.Co) 0,05%
cloreto de sódio (Fisher) 0,25%
azida sódica (Merck) 0,01%
cristal violeta (Allied Ch) 1:80.000
agar (Difco) 1,5%
pH 8,0

5. MEIO DE MACCARTHY & SNYDER

agar simples
sangue desfibrinado de coelho 5%
vancomicina (Lilly) 7,5 ug/ml
sulfato estreptomocina (Lilly) 20 ug/ml

6. AGAR SANGUE

VANCOMICINA (LILLY) 75, MG/ML

7. MEIO DE ONISI com PH 7,0

8. MEIO DE ONISI com sêro de cavalo 5%

As placas foram incubadas à 37°C, durante 4 dias, em anaerobiose (95% Nitrogênio e 5% gás carbônico), usando-se jaras tipo Brewer.

A contagem das colônias circulares, convexas, iridiscentes, típicas de *Fusobacterium* (figuras 1 e 2) foi procedida em mi-

microscópio estereoscópico (aumento 32x) com luz incidindo sobre a superfície colonial. A bacterioscopia sempre mostrava bastonetes finos, de extremidades afiladas, gram negativos, às vezes apresentando grânulos roxos nas extremidades ou ao longo do citoplasma (figura 3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com material de doze pacientes analisamos a capacidade seletiva do meio de Omata & Disraely, MacCarthy & Snyder, Agar-sangue-vancomicina em relação ao rendimento oferecido pelo agar sangue. Os resultados estão representados na Tabela 1. O meio de Omata & Disraely cuja seletividade parece depender da adição do cristal violeta e da estreptomina, isolou menos fusobactéria que o agar sangue. A diferença entre as médias obtidas é estatisticamente significativa, na base do teste de Student ($P < 0,001$). Evidentemente, a ação inibitória do meio de Omata & Disraely sobre a flora de associação foi muito acentuada, mas não foi total, pois *Veillonella*, *Streptococcus* e "difteroides" ainda cresceram neste meio seletivo. Embo-

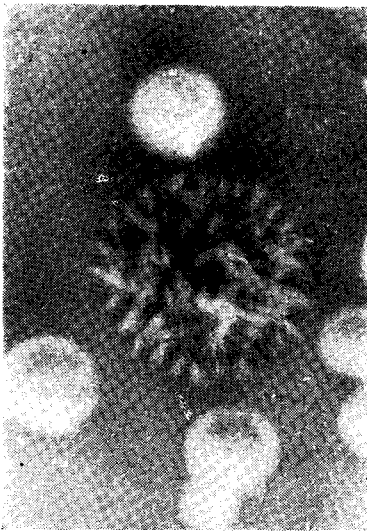


FIGURA 1: Aspecto da morfologia colonial de *Fusobacterium* em meio de Omata & Disraely, após 4 dias de incubação em anaerobiose (95% de Nitrogênio e 5% de gás carbônico) Aumento de 42 X.



FIGURA 2: Aspecto da morfologia colonial de *Fusobacterium* em meio de Omata & Disraely. Aumento de 90 X.

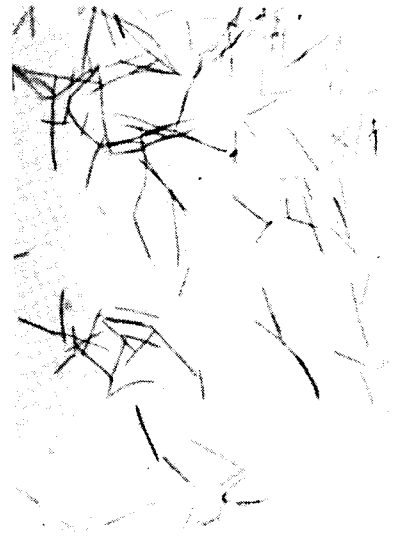


FIGURA 3: Esfregaço corado pelo método de Gram a partir de uma colônia de *Fusobacterium* crescida em meio de Omata & Disraely, após 4 dias de incubação em anaerobiose.

ra o agar sangue não elimine a flora de associação, como foi constatado com o de Omata & Disraely, seu emprêgo na pesquisa de *Fusobacterium* não fica anulado, porque será sempre conveniente reconhecer as colônias ao microscópio, pelo aspecto da superfície, conforme mostram as figuras 1 e 2.

O meio sugerido por MacCarthy & Snyder, agar-sangue adicionado de estreptomina e vancomicina, isolou tanto *Fusobacterium* quanto o agar sangue e ainda reduziu bastante a flora concomitante. A diferença entre as médias de isolamento de *Fusobacterium* não teve significação estatisticamente. Entretanto, o meio de MacCarthy & Snyder isolou mais fusobacteria que o meio seletivo sugerido por Omata & Disraely ($P < 0,02$).

O agar sangue-vancomicina selecionou tanto fusobacteria quanto o meio de MacCarthy & Snyder, entretanto este último foi mais impediante para a flora de associação ($P < 0,01$) provavelmente devido à presença da estreptomina.

Assim, parece que os antibióticos adicionados aos meios, estreptomina e vancomicina, não afetam o isolamento de *Fusobacterium*, pois, no agar-sangue vancomicina e no meio sugerido por MacCarthy & Snyder, o isolamento de microrganismos fusiformes foi comparável ao do agar-sangue. Por outro lado, há indícios de que o reduzido número de fusobacteria isolado no meio de Omata & Disraely foi determinado pela adição do cristal violeta para também inibir a flora associativa. De Araújo & Gibbons (4) anteriormente demonstraram que, no meio de Omata &

Disraely, a seletividade dependia do cristal violeta, porque a estreptomina não se mostrava eficiente na inibição da flora concomitante.

Com material de 16 pacientes procuramos comparar o rendimento do meio de Onisi em relação ao meio de Omata & Disraely, de emprêgo mais comum entre os pesquisadores. Os resultados são apresentados na Tabela 2. O meio sugerido por Omata & Disraely isolou mais fusobacteria que o meio de Onisi ($P < 0,001$). O meio de Onisi parece bastante impediante, inclusive para a flora de associação, e, ao que parece, neste aspecto, depende da azida sódica, pois quando removida do meio houve aumento do número de colônias de outros microrganismos, diferença estatisticamente significativa ($P < 0,001$). A ausência da azida sódica todavia não alterou o isolamento de fusobacteria, pois a média do isolamento não diferiu com expressão significativa (tabela 2).

Parece que o baixo rendimento do meio de Onisi, para isolamento de *Fusobacterium*, pode ser explicado pela composição do meio nutritivo, destituído de proteínas naturais comumente exigidas no isolamento destes microrganismos. Assim, removendo-se do meio de Omata & Disraely a quantidade de sôro de cavalo proposta,

Tabela 1: Isolamento de *Fusobacterium* e da flora de associação nos meios seletivos de Omata & Disraely e de MacCarthy & Snyder (número de colônias por grama do material $\times 10^7$)

MATERIAL	Fusobacterium				Outros			
	A.S.	Omata	M-S	A.S+VA.	A.S.	Omata	M-S	A.S+VA.
1	60	8	9	26	720	2	48	115
2	50	18	56	115	550	12	35	134
3	60	9	12	12	750	28	59	221
4	30	6	7	11	550	1	0	7
5	110	5	45	62	660	0,8	18	70
6	70	15	60	36	420	10	35	86
7	20	5	10	12	380	14	15	78
8	60	12	40	30	350	4	101	175
9	10	3	5	9	310	18	5	105
10	20	2	2	3	220	1	0	14
11	40	10	14	6	350	2	51	157
12	110	10	68	62	580	7	28	122
Média	53	9	27	32	486	8	33	107
S— x	9,36	1,33	7,10	9,55	49,6	2,45	7,98	17,95

Tabela 2: Isolamento de *Fusobacterium* e da flora de associação nos meios de Omata & Disraely e Onisi (número de colônias por grama do material x 10⁷)

MATERIAL	Fusobacterium				Outros			
	Omata	Omata s/sôro	Onisi s/azida	Onisi c/azida	Omata	Omata s/sôro	Onisi s/azida	Onisi c/azida
1	84	23	35	0	5	1	8	0
2	80	73	49	87	82	25	54	17
3	78	56	53	14	35	3	152	0
4	50	64	35	5	30	34	19	2
5	25	14	10	0	3	3	7	1
6	144	45	56	14	39	9	58	14
7	170	56	10	24	80	2	0	0
8	83	55	20	36	162	4	12	13
9	138	35	9	22	50	6	26	0
10	79	37	56	68	246	10	143	2
11	5	26	21	2	18	11	15	1
12	85	15	29	6	34	16	10	3
13	205	22	27	13	61	6	2	2
14	106	8	25	2	153	0	15	0
15	14	0	4	2	0	0	20	0
16	87	88	20	16	119	12	80	0
Média	89	38	29	19	70	9	39	3
S— x	13,6	6,2	4,3	6,2	12,8	2,3	12	1,4

Tabela 3: Isolamento de *Fusobacterium* e da flora de associação nos meios de Omata & Disraely, Onisi adicionado de sôro e Onisi com pH 7,0 (número de colônias por grama do material X 10⁷)

MATERIAL	Fusobacterium				Outros			
	Cmata	Onisi	Onisi c/sôro	Onisi pH7,0	Cmata	Onisi	Onisi c/sôro	Onisi pH7,0
1	60	4	29	12	70	0	8	1
2	80	81	151	69	128	6	27	2
3	23	8	64	12	38	111	220	100
4	61	50	160	19	2	5	132	0
5	131	44	37	26	74	0	252	6
6	46	9	21	5	113	5	56	1
7	27	6	3	5	37	93	264	100
8	40	13	58	7	23	7	24	6
9	87	10	73	19	67	3	96	45
10	80	55	101	40	62	2	156	3
11	85	24	38	18	210	6	225	7
12	30	19	64	35	38	11	14	5
13	40	17	33	5	11	23	107	16
14	64	14	148	4	26	11	22	20
Média	61	25	70	20	64	20	114	22
S— x	8,1	6,1	13,6	4,8	14,7	9,4	24,5	9,3

o rendimento do meio foi sensivelmente reduzido, havendo uma diferença estatisticamente significativa entre as médias obtidas ($P < 0,01$) (tabela 2). Em adição, como mostra a Tabela 3, o meio de Onisi com soro de cavalo à 5% possibilitou aumentar o isolamento de fusobacteria ($P < 0,01$), análise realizada com material de 14 pacientes e tendo ainda o meio de Omata & Disraely como referência. O meio de Onisi com soro de cavalo comportou-se como o meio de Omata & Disraely no aspecto do isolamento de *Fusobacterium*. Entretanto, o pH 8, sugerido para o meio de Onisi, com a finalidade de aumentar a capacidade impediendo do meio, parece não ter justificativa prática, como demonstram os resultados da tabela 3 cuja diferença entre as médias não tem

significação estatística. Com o pH 7 ou pH 8 o meio de Onisi isola a mesma quantidade de fusobacteria e inibe a mesma quantidade dos germes de associação.

Os resultados do presente trabalho de certo modo confirmam as informações de Prévot (10) sobre a ocorrência de amostras de *Fusobacterium* sorolófilas e outras menos exigentes, como, provavelmente, as isoladas no meio seletivo de Onisi.

Como o estudo da ecologia da boca vem preferindo métodos quantitativos, como o empregado no presente trabalho, para definir a microbiota anfibiótica dos nichos ecológicos bucais, achamos que conhecer o rendimento dos meios seletivos empregados numa investigação será de grande importância para o estudo crítico dos resultados obtidos.

S U M M A R Y

Gingival debris was collected with sterile periodontal scalers from patients with healthy gingiva and from periodontally involved patients to compare the effectiveness of selective media for isolation of Fusobacterium.

The material was weighed out on aluminum foil (previously weighed), homogenized, diluted into phosphate buffer (0,067 M-pH7,2), and 0,1 ml was plated out on blood agar, blood agar-vancomycin (7,5 ug/ml), Omata & Disraely agar, Omata & Disraely agar without horse serum, McCarthy & Disraely agar, Onisi agar with horse serum, and Onisi agar with pH 7,2. In all cases the plates were incubated at 37°C, in anaerobic Brewer jars with 95% nitrogen and 5% carbon dioxide for four days.

McCarthy & Snyder agar was so effective as the plain blood agar in relation to the isolation of Fusobacterium; on the other hand, it inhibited the concomitant flora. Omata & Disraely agar (with crystal violet and streptomycin) was inhibitory for fusobacteria, too. A few number of fusobacteria was isolated in the Onisi medium (without serum). Probably those strains did not require natural proteins.

BIBLIOGRAFIA

1. BÖE, J. — *Fusobacterium* (studies on its bacteriology, serology and pathogenicity, Kommisjon HOS JACOB DYBWAD, Oslo, 1941).
2. BROCARD, H. & DAUM, S. — Les abcès cérébraux d'origine pulmonaire à *Bacillus fusiformis*. Apud Tynes, B. S. & Utz, J.P. — *Fusobacterium* septicemia. Am. J. Med. 29: 879-887, 1960.
3. BROCARD, H.; CHOFFEL, C. & BOUVIER, M. — Les infections pulmonaires à Bacilles fusiformes, Apud Tynes, B.S. & Utz, J.P. — *Fusobacterium* septicemia. Am. J. Med. 29: 879-887, 1960.
4. DE ARAUJO, W.C. & GIBBONS, R.J. — Ineffectiveness of Streptomycin as a selective agent in the cultivation of Oral fusobacteria. J. Bacteriol. 84: 593-594, 1962.
5. DICK, G.F. — Fusiform Bacilli Associated with various pathological process. J. Inf. Dis. 12: 191-198, 1913.
6. MCCARTHY, C. & SNYDER, M.L. — Selective medium for fusobacteria and *Leptotrichia*. J. Bacteriol. 86: 158-159, 1963.

7. OMATA, R.R. & DISRAELY, M.N. — A selective medium for oral fusobacteria. *J. Bacteriol.* 72: 677-680, 1956.
8. ONISI, M. — A selective medium for counting fusiform organisms in dental specimens. *J. dent. Res.* 38: ... 311-322, 1959.
9. PRATT, J.S. — On the biology of *B. fusiformis*. *J. inf. Dis.* 41: 461-466, 1927.
10. PREVOT, A.R. — Manuel de classification et de détermination des bactéries anaérobies, 3.^a ed., Masson et Cie., Paris, 1957.
11. ROSENOW, E.C. & TUNICLIFF, R. — Pyemia due to an anaerobic polymorphic bacillus, probably *Bacillus fusiformis*. *J. inf. Dis.* 10: 1-6, 1912.
12. SMITH, E.C. — Inoculation experiments with *Bacillus fusiformis* isolated from tropical ulcer with observations on the bacillus. *J. Hyg. Camb.* 33: 95-102, 1933.
13. TYNES, B.S. & UTZ, J.P. — Fusobacterium septicemia. *Am. J. Med.* 29: 879-887, 1960.
14. VELLON & ZUBER — Recherches sur quelques microbes strictement anaérobies et leur rôle en pathologie. *Arch. Med. Ex. et Anat. Path.* 10: 517-545, 1898.
15. VINCENT, H. — Sur l'étiologie et pur les lésions anatomo-pathologiques de la pourriture D'Hospital. *Ann. Inst. Pasteur* 10: 488-510, 1896.
16. WILLIAMS, R.H. — Fusopirochetosis: Recovery of the causative organisms from the blood with report of two cases. *Arch. Int. Med.* 68: 80-93, .. 1941.