

## **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-estreptomicina e estreptomicina-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 concomitante.

## 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 estreptomicina (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 estreptomicina (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%

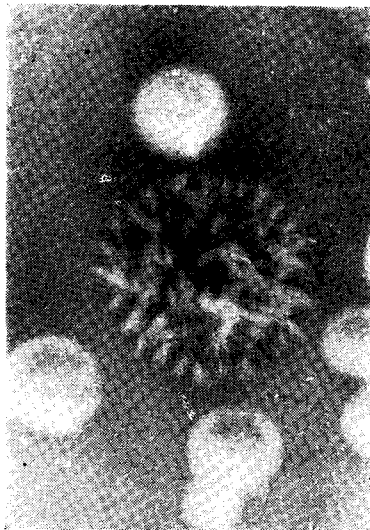
As placas foram incubadas à 37°C, durante 4 dias, em anaerobiose (95% Nitrogênio e 5% gás carbônico), usando-se jaras tipo Brewer.

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

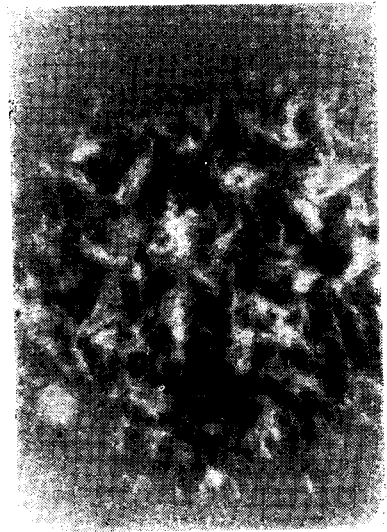
microscópio estereoscópico (aumento 32x) com luz incidindo sobre a superfície colonial. A bacterioscopia sempre mostrava bastonetes finos, de extremidades afiladas, gram negativos, às vezes apresentando grânulos roxos nas extremidades ou ao longo do citoplasma (figura 3).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

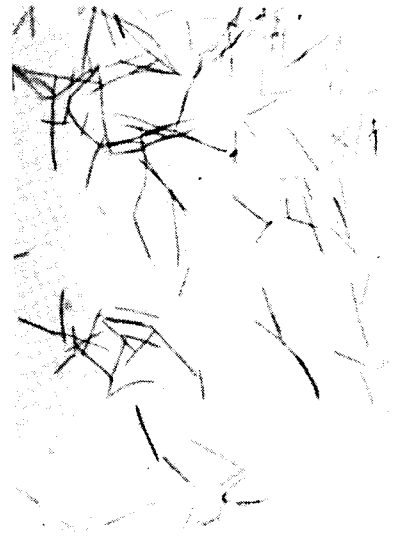
Com material de doze pacientes analisamos a capacidade seletiva do meio de Omata & Disraely, MacCarthy & Snyder, Agar-sangue-vancomicina em relação ao rendimento oferecido pelo agar sangue. Os resultados estão representados na Tabela 1. O meio de Omata & Disraely cuja seletividade parece depender da 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 emprego 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 10<sup>7</sup>)

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 10<sup>7</sup>)

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.<sup>a</sup> 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.