Vol. 1, n.º 1, p. 1-60
1970

# REVISTA DE MICROBIOLOGIA

Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

# REVISTA
DE
# MICROBIOLOGIA

| Rev. Microbiol. | Vol. 1 | N.º 1 | Pág. 1 - 60 | Julho / Setembro, 1970 |
|---|---|---|---|---|

## CONTEÚDO

ARTIGOS ORIGINAIS — Pág.

Single and multiple transferable drug resistance among clinically isolated *Shigella* strains — M. R. F. de TOLEDO, M. E. ZULIANI & L. R. TRABULSI ..... 1

Crescimento e viabilidade de *Salmonella* em diversas variações do meio de RAPPAPORT — D. P. FALCÃO & I. SUASSUNA ..... 13

Pesquisa de aglutininas anti-leptospira em soros de trabalhadores de diversas profissões — C. A. SANTA ROSA, A. L. COSCINA, A. F. P. de CASTRO, A. S. da SILVA & J. C. QUEIROZ ..... 19

Influence of streptomycin on the production of pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa* — F. ALTERTHUM ..... 25

Pesquisa de aflatoxina B-1 e substâncias fluorescentes similares em farinha de trigo — A. PURCHIO ..... 33

MÉTODOS DE LABORATÓRIO

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Depto. de Microbiologia – ICB II – USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – Cid. Universitária
CEP 05508-900 – São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.cjb.net

ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
**Departamento de Microbiologia e Parasitologia**
Rua Botucatu, 720 — Caixa Postal 7.144
São Paulo — Brasil

## SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

*Sócios Patrocinadores*

BIOLAB — PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

CELM — COMPANHIA EQUIPADORA DE LABORATÓRIOS MODERNOS

ELI LILLY DO BRASIL LTDA.

INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS FONTOURA WYETH S. A.

INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA SCHERING S. A.

JOHNSON & JOHNSON S. A. INDÚSTRIA E COMÉRCIO

LABORTERÁPICA BRISTOL S. A. INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA

LABORATÓRIO ROCHE — PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS

LAFI — PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS

MICRONAL S. A. — APARELHOS DE PRECISÃO

PFIZER QUÍMICA LTDA.

## 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.

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

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

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 têrmos de unidades internacionais (*Enzyme Nomenclature,* Elsevier Publishing Co., 1965). Para expressar comprimentos, pêsos e volumes, os prefixos nano (n) e pico (p) devem ser usados em lugar de milimicro (m$\mu$) e micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em nanômetros (nm; $10^{-9}$ m) ou em micrômetros ($\mu$m; $10^{-6}$ m), ou ainda, em Angstroms (A; $10^{-10}$ m). Partes por milhão (ppm), devem ser expressas como microgramos por mililitros ($\mu$g/ml), ou microlitros por litro ($\mu$ litros/litro). A *Revista* se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DOS MICRORGANISMOS — A combinação binária, nome do gênero seguido do nome da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7.ª ed., 1957) obedecida. Se um Autor divergir dessa nomenclatura, seu próprio julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente do Manual de Bergey deve ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nôvo 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 dêstes, os redigidos em inglês devem ser acompanhados de um resumo em português e os redigidos em português e espanhol de um resumo em inglês. Êstes 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 *Chemical Abstracts.* Citações de resumos, teses, "dados não publicados", comunicações pessoais" e "no prelo", não serão aceitas como referências bibliográficas.

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

ILUSTRAÇÕES — Um conjunto completo de figuras, preferìvelmente como fotografias, deve acompanhar cada uma das duas vias do manuscrito. Os gráficos devem ser desenhos concluídos e que não requeiram qualquer montagem ou re-arranjo. Parte alguma de um gráfico poderá ser datilografada (exceto a legenda, que deve constar em página separada). Tôdas as legendas devem ser feitas com um e o mesmo normógrafo. A maioria dos gráficos será reduzida à largura de cêrca 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 — A *Revista* oferecerá a cada Autor, gratuitamente, 10 exemplares.

**EDITORIAL**

# À GUISA DE APRESENTAÇÃO

A necessidade de um órgão de divulgação das atividades dos brasileiros nos campos da Microbiologia e ciências afins, de há muito era sentida.

A realização da I.ª Jornada Brasileira de Microbiologia, nos dias 4 e 5 de novembro de 1969, além de tôdas as expectativas revestida de um sucesso magnífico, determinou — pelo comparecimento de mais de 300 participantes, e de quase 200 sócios em Assembléia Geral — que a mesma fôsse considerada o 1.º Congresso Brasileiro de Microbiologia, e mostrou que a necessidade acima referida podia alicerçar-se em uma possibilidade real de dispormos em têrmos nacionais do nosso próprio órgão de divulgação e comunicação. Essa possibilidade foi interpretada com base no que podíamos definir sôbre os erros, as limitações e as dificuldades da imprensa médica e técnico-científica no Brasil cujos problemas só podem ser interpretados, em têrmos da realidade sócio-cultural vigente, comum a tôda a América Latina [1].

Nessas circunstâncias já fôra sentido, não sòmente o aspecto imprescindível de um esquema financeiro viável, sem as limitações de orçamentos insuficientes ou verbas espasmódicas, mas também o papel destacado e mantenedor de uma política editorial sã, desempenhado por um conselho de redação ou corpo editorial independente e de alto padrão técnico-científico. Diante dêsses objetivos faz-se necessário que sejam abandonadas as atividades de amadores e as atitudes românticas, com a adoção de uma mentalidade e um esquema empresarial, em que se tomem em conta as estimativas aproximadas, ou tanto quanto possível seguras do "mercado produtor" de comunicações científicas, válidas e aferidas pelos padrões publicitários internacionais. Só êsses padrões podem vir a assegurar a circulação da *Revista de Microbiologia* através do conhecimento e do acesso ao mercado profissional "consumidor" de suas informações. De fato, nascida da necessidade sentida pelos brasileiros, a *Revista de Microbiologia* será publicada em *português, espanhol, inglês*, e pretende atingir inicialmente a consideração e a estima dos povos das Américas, drenando, conseqüentemente, na medida da confiança que venha a merecer a sua colaboração e as comunicações que queiram fazer em suas páginas.

A *Revista* nasce, portanto, não para competir, mas para servir, não para dividir, mas para congregar, desvinculada de grupos, de instituições e mesmo de regionalismos, e preenche um claro entre numerosos grupos profissionais e científicos interessados na Microbiologia, em quaisquer dos seus aspectos.

Repetindo embora algumas palavras anteriores [1] queremos reiterar que "êsses caminhos parecem difíceis ùnicamente por implicarem em alguns casos, na mudança de mentalidade e de algumas tradições culturais, mas, a julgar pelo que progressivamente vem ocorrendo em tantos outros países, será difícil também, que dêsses caminhos nos possamos afastar no ambiente brasileiro". Corresponde a um imperativo coletivo que a *Sociedade Brasileira de Microbiologia* tomou a si, como afirmação nacional, econômica e até mesmo estratégica, além do seu óbvio valor cultural.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. SUASSUNA, I. — Perspectivas da imprensa médica no Brasil. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, 2:53-57, 1968.

São Paulo, julho de 1970.

*Italo Suassuna*

Instituto de Microbiologia da U.F.R.J. e
Faculdade de Ciências Médicas, U.E.G.
Rio de Janeiro, GB, Brasil

*Rev. Microbiol.*
*1(1):1-11, julho-setembro, 1970*

# SINGLE AND MULTIPLE TRANSFERABLE DRUG RESISTANCE AMONG CLINICALLY ISOLATED *SHIGELLA* STRAINS

Maria Regina Fernandes de TOLEDO [1], Maria Elisa ZULIANI [2] and Luiz R. TRABULSI [3]

## SUMMARY

A survey of transferable drug resistance in 209 *Shigella* strains resistant to one or more of the following drugs; i.e. to Sulphadiazine (Su), Streptomycin (S), Tetracyclin (T), Chloramphenicol (C) and Kanamycin (K) was carried out. This kind of drug resistance was encountered in 102 (48.8%) of the 209 strains. Transfer was 100% for SuSTCK, SuSTK and SuTCK strains; 84-89.5% for SuSTC, SuST and SuT strains; 12-20.9% for Su and SuS strains. Of the 102 strains capable of transferring their resistance, 95 had two or more markers, while 7 had only one (Su). Of the 95, thirteen transferred only part of the markers. The markers which were not transferred were always Su or S or both of them. Of the 82 strains which transferred all their markers, 12 gave rise to different resistant progenies of the recipient strain.

The resistance levels expressed by the recipient *E. coli* K12 strain were inferior to those of the donor *Shigella* with respect to S and K, generally superior with respect to C and approximately identical with respect to T and Su. As to the levels transferred from one *E. coli* K12 strain to another, no significant differences were found for any drug.

The production of colicins actives against the recipient *E. coli* K12 strain by most of the *Shigella sonnei* strains was a very important cause for failure of transference. However, this was corrected by using a *E. coli* K12 strain resistant to the *Shigella sonnei* colicins.

## INTRODUCTION

Resistance to multiple antibacterial drugs, transmissible from one bacterial cell to another, was first described by Japanese workers in *Shigella* strains in 1959 [12].

This type of drug resistance is called transferable or infectious drug resistance because it can spread rapidly through a sensitive population of cells. It depends on the presence in the cell of an extrachromosomal genetic element, the resistance factor (R factor) wich can be accepted as a variable number of genes for drug resistance linked to a sexual factor, generally called the resistance transfer factor (RTF). The latter confers the ability to conjugate and to transfer the drug-resistance genes. Drug resistance due to R factors has important clinical, epidemiological and biological implications and work in these fields has been extensively reviewed [3, 5, 7, 12].

The purpose of this paper is to report the results of an investigation on the frequency of R factors in 209 drug-resistant *Shigella* strains, isolated from infected patients in São Paulo, Brazil. Strains of the 4 *Shigella* subgroups were included, as well

(1-2-3) Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina da U.S.P., São Paulo, Brasil
Present address: Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 720 — São Paulo, Brasil

as representatives of all kinds of resistant strains encountered, both single and multiple — resistant ones.

## MATERIAL AND METHODS

*Shigella strains* — 209 *Shigella* strains with resistance to one or more of the following drugs, i.e., to Sulphadiazine (Su), Streptomycin (S), Tetracyclin (T), Chloramphenicol (C) and Kanamycin (K) were selected for this study. Of these, 6 belonged to the *Sh. dysenteriae*, 153 to the *Sh. flexneri*, 2 to the *Sh. boydii*, and 48 to the *Sh. sonnei* subgroup. The number of each kind of resistant strain is found in Table I. The criterion for the distinction between resistant and sensitive strain will be published elsewhere.

TABLE I

Resistant *Shigella* strains studied as to the frequency of the R factors

| Subgroup | Pattern of resistance | no. of strains |
|---|---|---|
| *Sh. dysenteriae* | Su STCK | 1 |
| | Su S | 2 |
| | Su | 3 |
| *Sh. flexneri* | Su STCK | 29 |
| | Su STC | 19 |
| | Su STK | 4 |
| | Su ST | 13 |
| | Su S | 41 |
| | Su T | 7 |
| | Su | 39 |
| | S | 1 |
| *Sh. boydii* | Su STK | 1 |
| | Su | 1 |
| *Sh. sonnei* | Su STCK | 7 |
| | Su TCK | 1 |
| | Su STK | 1 |
| | Su ST | 2 |
| | Su S | 19 |
| | Su T | 2 |
| | Su K | 1 |
| | Su | 15 |
| Total | | 209 |

*Escherichia coli K12 strains* — 1) *E. coli* K12 J5 $F^-$ $lac^+$ $pro^+$ $met^+$ (*E. coli* J5) was kindly supplied by Dr. Naomi Datta (Department of Bacteriology, Royal Postgraduate Medical School, London). This strain was used as recipient of the R factors from *Shigella*. 2) *E. coli* K12 J5 $F^-$ $lac^+$ $pro^+$ $met^+$ $col^R$ (*E. coli* $col^R$), a mutant resistant to colicins, obtained from *E. coli* J5 cultured in a medium previously inoculated with a colicin producing *Sh. sonnei* strain. This strain was also used as recipient of the R factors from *Shigella*. 3) *E. coli* K12 J5 $F^-$ $lac^+$ $pro^-$ $met^-$ $NA^R$ (*E. coli* $NA^R$), a mutant resistant to 50 $\mu$g/ml of nalidyxic acid (NA) obtained from *E. coli* J5 in a medium containing the drug. This strain was used as recipient of the R factors of *E. coli* J5 and *E. coli* $col^R$.

All three strains were sensitive to 5 $\mu$g/ml sulfadiazine, streptomycin, tetracyclin, and kanamycin, in minimal medium and others. Previous to their use, it was ascertained whether *E. coli* $col^R$ and *E. coli* $NA^R$ maintained an adequate recipient capacity and proliferated satisfactorily in the culture media used.

### *Culture media*

1) Medium for general use and conjugation: tryptic soy broth (Difco).

2) Medium for the determination of antibiotic sensitivity: DST Agar Base (Oxoid).

3) Medium to determine the sensitivity to sulfadiazine: nutrient agar (LabLemco Agar Oxoid), containing 5% hemolysed horse blood [6].

4) Medium for the selection of recipient clones: minimal medium of DAVIS & MINGIOLI [4], containing lactose, bromothymol blue, and the drugs. The adequate concentration of each drug, determined previously, was (in $\mu$g/ml): tetracyclin, 5; streptomycin, chloramphenicol, and kanamycin, 10; sulfadiazine, 50; nalidyxic acid, 20.

5) Others: MacConkey agar and Lab Lemco Broth (Oxoid).

*Determination of drug sensitivity* — The salts of the drugs, their origin and diluents, as well as the techniques used, are described elsewhere [11].

*Study of colicins* — The ABBOTT & SHANNON method [1] was used. Colicins active against *E. coli* J5 were investigated in all *Shigella* strains which failed to transfer their resistance in one or more experiments.

*Resistance transfer*

1) From *Shigella* to *E. coli* J5 and *E. coli* $col^R$

Donor and recipient strains were cultivated separately in tryptic soy broth for 16-18 hours at 37°C. Afterwards, 0.1 ml of each culture was added to 1 ml of sterile tryptic soy broth and incubated at 37°C. After 4 hours of incubation, 0.1 ml of the mixed culture was plated on minimal medium containing the drugs (1 to each plate) against which the donor culture was resistant. Simultaneously, a MacConkey agar plate was inoculated with the mixed culture and one or more minimal medium plates, containing the drugs, with 0.1 ml of the recipient culture, cultivated for the same length of time as the mixed cultures. The purpose of the first plate was to detect a possible antagonism between the donor and the recipient cultures, while the latter were used to exclude recipients which might have mutated to resistance to one of the drugs.

After incubation of the plates containing minimal medium for 48 hours they were examined and the growth present in each one was purified by inoculation into MacConkey medium. After the purification of the recipient, 5 colonies of each plate were transferred individually to nutrient broth, and incubated at 37°C for 16-18 hours. Each broth was then diluted 1:1000 with the same medium and the sensitivity of each progeny determined by seeding the contents of a platinum loop of 2 mm in diameter into DST agar containing the drugs at the same concentrations used in the minimal media. Once the sensitivity of each progeny was determined, they were stocked for retransfer and the determination of resistance levels.

During the first phase of the study, the 209 *Shigella* strains were crossed with *E. coli* J5. After this, *E. coli* $col^R$ was obtained and all the *Shigella* strains capable of producing colicins active against *E. coli* J5 were crossed with this strain.

2) From *E. coli* J5 or *E. coli* $col^R$ to *E. coli* $NA^R$

The procedure was identical to that described for the transfer of resistance from *Shigella* cultures, to *E. coli* J5 or *E. coli* $col^R$ except for the following modifications: a) The resistant progenies of *E. coli* $NA^R$ were selected in a minimal medium plate containing 20 $\mu$g/ml nalidyxic acid and one of the drugs against which the donor culture was resistant; b) The resistance of only 2 or 3 progenies of *E. coli* $col^R$ was determined. Also, the retransfer ability of only part of the strains was studied.

## RESULTS

1) Transfer of resistance of *Shigella* strains of the 4 subgroups to *E. coli* J5

The results in Table II show a marked difference between the behavior of the *Sh. sonnei* subgroup when compared to that of the other subgroups. While 50% or more of the strains of *Sh. dysenteriae, Sh. flexneri* and *Sh. boydii* transferred their resistance to *E. coli* J5, this only occurred with 12.5% of the *Sh. sonnei* strains. This difference in behavior is even more accentuated when the tetra - or penta - resistant strains of the 4 subgroups are compared. Not a single *Sh. sonnei* strain, with these patterns of multiple resistance, transferred its markers, the opposite being true for the *Sh. dysenteriae, Sh. flexneri* and *Sh. boydii* strains. With two exceptions only, these strains transferred all or part of their markers.

2) Study of the colicins active against *E. coli* J5

When the results of all transfer experiments were reexamined, it became evident that in the experiments with *Sh. sonnei, E. coli* J5 frequently failed to proliferate in the MacConkey medium, inoculated to verify a possible antagonism between the donor and the recipient cultures. In view of this finding, the production of active colicins against *E. coli* J5 was investigated in all strains which failed to transfer their resistance. The results of this study are found in Table III. Not a single strain of *Sh. dysenteriae, Sh. flexneri* or *Sh. boydii* produced colicins active against *E. coli* J5, however, the growth of this recipient was inhibited, totally or partially, by all 42 *Sh. sonnei* strains, which failed to transfer their resistance markers in the previous experiments.

3) Transfer of *Sh. sonnei* resistance to *E. coli* $col^R$

The results of these experiments are found in Table IV. It is evident that all tetra-or penta-resistant strains transferred all or part of their markers to *E. coli* $col^R$, the same being true for one SuS and one SuT strain which had not transferred their resistance to *E. coli* J5.

TABLE II

Resistance transfer from the 4 *Shigella* subgroups to *E. coli* J5

| Subgroup | Resistance pattern | no. of strains | no. of strains which transferred all or some markers | % | no. of strains in each subgroup which transferred their resistance | % |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Sh. dysenteriae* | Su STCK | 1 | 1 | 100.0 | 4 | 66.6 |
| | Su S | 2 | 1 | 50.0 | | |
| | Su | 3 | 2 | 75.0 | | |
| *Sh. flexneri* | Su STCK | 29 | 29 | 100.0 | 80 | 52.9 |
| | Su STC | 19 | 17 | 89.9 | | |
| | Su STK | 4 | 4 | 100.0 | | |
| | Su ST | 13 | 12 | 92.3 | | |
| | Su S | 41 | 6 | 14.6 | | |
| | Su T | 7 | 7 | 100.0 | | |
| | Su | 39 | 5 | 12.8 | | |
| | E | 1 | 0 | 0.0 | | |
| *Sh. boydii* | Su STK | 1 | 1 | 100.0 | 1 | 50.0 |
| | Su | 1 | 0 | 0.0 | | |
| *Sh. sonnei* | Su STCK | 7 | 0 | 0.0 | 6 | 12.5 |
| | Su TCK | 1 | 0 | 0.0 | | |
| | Su STK | 1 | 0 | 0.0 | | |
| | Su ST | 2 | 1 | 50.0 | | |
| | Su S | 19 | 5 | 25.7 | | |
| | Su T | 2 | 0 | 0.0 | | |
| | Su K | 1 | 0 | 0.0 | | |
| | Su | 15 | 0 | 0.0 | | |
| Total | | 209 | 91 | | 91 | |

TABLE III

Production of active colicins against *E. coli* J5 by *Shigella* strains which did not transfer their resistance

| Subgroup | no. of strains | no. of strains which did not transfer their resistance | Colicins producers | |
|---|---|---|---|---|
| | | | no. | % |
| *Sh. dysenteriae* | 6 | 2 | 0 | 0.0 |
| *Sh. flexneri* | 153 | 73 | 0 | 0.0 |
| *Sh. boydii* | 2 | 1 | 0 | 0.0 |
| *Sh. sonnei* | 48 | 42 | 42 | 100.0 |
| Total | 209 | 118 | 42 | 20.0 |

TABLE IV

Resistance transfer by *Shigella sonnei* strains to *E. coli* col $^{R}$

| Pattern | no. of strains | no. of strains which transferred all or part of their markers | % |
|---|---|---|---|
| Su STCK | 7 | 7 | 100.0 |
| Su TCK | 1 | 1 | 100.0 |
| Su STK | 1 | 1 | 100.0 |
| Su ST | 1 | 1 | 50.0 |
| Su S | 14 | 1 | 5.2 |
| Su T | 2 | 1 | 50.0 |
| Su K | 1 | 0 | 0.0 |
| Su | 15 | 0 | 0.0 |
| Total | 42 | 12 | 28.5 |

4) Transfer of the resistance of all *Shigella* strains to *E. coli* J5 or *E. coli* col$^{R}$

The results of all the experiments of transference are found in Table V. In general, the results are uniform for the 4 *Shigella* subgroups, a narrow relationship being found, however, between the resistance patterns of the *Shigella* strains and the transfer results. Transfer was 100% for SuSTCK, SuSTK and SuTCK strains; 84-89.5% for the SuSTC, SuST, and SuT strains; 12-20.9% for Su and SuS strains. The SuK and S strains did not transfer their markers. Altogether 102 strains were capable of transferring their resistance.

5) Partial or total transfer

Of the 102 strains capable of transferring their resistance, 95 had two or more markers, while 7 had only one (Su). Of the 95, 13 transferred only part of their markers. The markers which were not transferred were always Su and S or the two together (Table VI). Of the 82 strains which transferred all their markers, 12 gave rise to various resistant progenies of *E. coli* K12. Of these 6 were SuSTCK; 4, SuSTC; and 2, SuST (Table VII).

6) Retransfer of resistance from *E. coli* J5 or *E. coli* col$^{R}$ to *E. coli* NA$^{R}$

The retransfer was positive in all instances, the same markers of the donors *E. coli* J5 and *E. coli* col$^{R}$ being found, in general, in *E. coli* NA$^{R}$. Sometimes, however, segregation was noted.

7) Transfer of resistance in relation to each drug

When each drug is considered individually, it is evident from Table VIII that the resistance to Su was transferred by 44.7% of the strains; resistance to S in 55.0%; to T, in 94.2%; to C, in 96.5%; and to K, in 97.8%.

8) Transferred resistance levels

Table IX shows that the resistance levels expressed by *E. coli* J5 and *E. coli* col$^{R}$ were inferior to those of the donor *Shigellae* with respect to streptomycin and kanamycin; generally superior with respect to chloramphenicol and approximately identical with respect to tetracyclin and sulfadiazine. As to the levels transferred from *E. coli* J5 and *E. coli* col$^{R}$ to *E. coli* NA$^{R}$, no significant differences for any drug were found (Table X).

9) Stability of the resistance

To verify the stability of the R factors, the resistance levels of 30 *Shigella* and 30 *E. coli* J5 strains, were determined after 1 year of storage.

TABLE V

Resistance transfer of all *Shigella* strains to *E. coli* J5 or *E. coli* col $^{R}$

| Resistance pattern | no. of strains which transferred all or part of their markers/no. of strains with pattern | | | | | | | | Total of strains which transferred all or part of their markers | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Sh. dysenteriae* | % | *Sh. flexneri* | % | *Sh. boydii* | % | *Sh. sonnei* | % | | |
| Su STCK | 1/1 | 100.0 | 29/29 | 100.0 | — | | 7/7 | 100.0 | 37/37 | 100.0 |
| Su STC | — | | 17/19 | 89.5 | — | | — | | 17/19 | 89.5 |
| Su STK | — | | 4/4 | 100.0 | 1/1 | 100.0 | 1/1 | 100.0 | 6/6 | 100.0 |
| Su TCK | — | | — | — | — | | 1/1 | 100.0 | 1/1 | 100.0 |
| Su ST | — | | 12/13 | 92.3 | — | | 1/2 | 50.0 | 13/15 | 84.0 |
| Su S | 1/2 | 50.0 | 6/41 | 14.6 | — | | 5/19 | 26.3 | 13/62 | 20.9 |
| Su T | — | | 7/7 | 100.0 | — | | 2/2 | 100.0 | 8/9 | 88.8 |
| Su K | — | | — | — | — | | 0/1 | 0.0 | 0/1 | 0.0 |
| Su | 2/3 | 66.6 | 5/39 | 12.8 | — | | 0/1 | 0.0 | 7/58 | 12.0 |
| S | — | | 0/1 | 0.0 | — | | — | — | 0/1 | 0.0 |
| Total | 4/6 | 66.6 | 80/153 | 52.9 | 1/1 | 100.0 | 17/48 | 35.4 | 102/209 | 48.8 |

TABLE VI

Resistance markers not transferred by 13 *Shigella* strains carrying transferable resistance

| Resistance pattern | no. of strains which transferred part of their markers | Not transferred markers | no. of strains |
|---|---|---|---|
| Su STCK | 3 | Su S | 2 |
| | | Su | 1 |
| Su STK | 1 | S | 1 |
| Su ST | 4 | Su S | 1 |
| | | Su | 2 |
| | | S | 1 |
| Su S | 4 | Su | 1 |
| | | S | 3 |
| Su T | 1 | Su | 1 |
| Total | 13 | | 13 |

TABLE VII

Strains which transferred their markers jointly and separately

| Donor | Pattern of resistance | Recipient strains | |
|---|---|---|---|
| | | no. of colonies examined | Resistant progenies |
| 1. *Sh. flexneri* 21/66 | Su STCK | 45 | 30 Su STCK<br>8 Su STC<br>2 S C |
| 2. *Sh. flexneri* 35/66 | Su STCK | 40 | 39 Su STCK<br>1 Su STC |
| 3. *Sh. sonnei* 16/68 | Su STCK | 20 | 19 Su STCK<br>1 Su STC |
| 4. *Sh. flexneri* 2/67 | Su STCK | 40 | 39 Su STCK<br>1 T K |
| 5. *Sh. flexneri* 11/67 | Su STCK | 37 | 36 Su STCK<br>1 Su S |
| 6. *Sh. flexneri* 15/SD | Su STCK | 45 | 19 Su STCK<br>20 Su STC<br>4 Su TCK<br>1 Su SCK |
| 7. *Sh. flexneri* 21/64 | Su STC | 40 | 30 Su STC<br>5 Su S |
| 8. *Sh. flexneri* 16/SD | Su STC | 35 | 7 Su STC<br>19 Su S |
| 9. *Sh. flexneri* 3/68 | Su STC | 20 | 15 Su STC<br>5 T |
| 10. *Sh. flexneri* 1/68 | Su STC | 20 | 13 Su STC<br>3 T |
| 11. *Sh. flexneri* 60/65 | Su ST | 30 | 20 Su ST<br>10 Su |
| 12. *Sh. flexneri* 49/66 | Su ST | 15 | 4 Su ST<br>10 Su T |

TABLE VIII

Transferable resistance frequency with respect to each of the drugs

| Drug | no. of resistant strains | no. of strains which transferred their resistance | % |
|---|---|---|---|
| Su | 208 | 93 | 44.71 |
| S | 140 | 77 | 55.00 |
| T | 87 | 82 | 94.20 |
| C | 57 | 55 | 96.50 |
| K | 45 | 44 | 97.80 |

## DISCUSSION

The results obtained demonstrate that infective resistance is rather frequent in *Shigella* cultures isolated from dysentery patients. This form of resistance was found in 84% or more of all strains with 3, 4 and 5 markers. As to the strains with 2 markers, it is necessary to consider the SuT strains separately. Of the 9 strains with this pattern, R factors were found in 8, while in the 62 SuS strains, resistance was transferred only in 20.9%. When K-resistance, which apparently is very rare in Japan, is excluded, the results are very similar to those of MITSUHASHI et al.[8]. Among 434 *Shigella* strains, these Authors found R factors in all SuSTC, SuSC, SuST, and SuT strains. On the other hand, among the SuS, these factors were found in only 44% of the strains. In regard to the Su strains, our percentage of transference was 12%, which is again similar to the data of the above Authors.

Since in some strains with R factors some markers were not transferred and since the frequency of transfer depended on the type of strains, the participation of the R factors in the resistance of the strains studied can be better evaluated when each drug is considered separately. Thus, the data of Table IX show that for kanamycin, chloramphenicol and tetracyclin resistance was transferred in almost all strains, the same not being true for streptomycin and sulfadiazine. The resistance to these 2 drugs was transferred only to about half of the strains.

The single or multiple resistance present in a bacteria may not be transferred for a variety of reasons. One of these is the inhibition of one of the mating strains by colicins, as demonstrated by the present study. If this fact had not been verified the number of positive transfers, particularly for the SuSTCK strains, would have been much smaller. As far as we know, this type of incompatibility between donor and recipient cultures, as a cause for the failure of R factor transfer, has not been reported in studies on the evolution of the frequency of R factors in *Enterobacteriaceae* or other Gram-negative bacteria. Other causes for the lack of transfer include the chromosomal location of the marker, R factor without RTF, marked repression, etc.

Besides the study of colicins, no special effort was made in the present investigation to find the cause for the lack of resistance transfer by certain strains. However, the analysis of the results suggests a chromosomal location of the markers, at least in some strains, such as Su, SuS, and S strains. As noted before, the only S strain did not transfer its marker and the number of positive transfers of the Su and SuS strains was relatively low. On the other hand, Table VI shows that among the strains carrying R factors, the only markers not transferred were always Su, S or a combination of the two. These facts, together with the type of resistance, i.e., simple ou double, suggest chromosomal location for these markers. In a recent study, SZTURM-RUBINSTEN et al.[10] reported the inability of obtaining transfer through conjugation or elimination of these markers with acriflavine in *Shigella* cultures. If the location of these markers is chromosomal in our strains, it follows that we found the association of chromosomal and extrachromosomal resistance in 13 strains (Table IV). As to the others, which did not transfer their markers, i.e., 2 SuSTC and SuST, 1 SuT and SuK, the lack of transfer might have been due to various mechanisms, including chromosomal location, at least with respect to the last two strains. A detailed study of the strains which did not transfer their markers, including Su and SuS, is in progress.

The finding of two or more classes of resistant progenies in the recipient culture has been reported by other Authors, who studied the transfer of R factors through conjugation. The recent paper by ROMEIRO & NEYNELL[9] is very elucidating in this respect; these Authors demonstrated the presence of 2 R factors, one $fi^+$, the other $fi^-$, in various *E. coli* and *Salmonella* cultures, which gave origin to different progenies of the recipient strain. The same has been observed by BOUANCHAUD & CHABBERT[2] in conjugation

TABLE IX

Transferred resistance levels in part of the *Shigella* strains and levels expressed by the *E. coli* J5 and *E. coli* col R strains

| Resistance level | Sulphadiazine | | Streptomycin | | Tetracyclin | | Chloramphenicol | | Kanamycin | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *Shigella* | *E. coli* J5 or col R | *Shigella* | *E. coli* J5 or col R | *Shigella* | *E. coli* J5 or col R | *Shigella* | *E. coli* J5 or col R | *Shigella* | *E. coli* J5 or col R |
| 1,000 | 62 | 62 | — | — | — | — | — | — | 26 | — |
| 500 | — | — | 6 | — | — | — | — | — | 7 | 5 |
| 200 | — | — | 20 | — | 4 | 5 | 7 | 40 | — | 28 |
| 100 | — | — | 14 | — | 28 | 20 | 24 | 4 | — | — |
| 50 | — | — | 18 | 3 | 22 | 26 | 11 | 1 | — | — |
| 20 | — | — | 4 | 25 | 2 | 1 | 3 | — | — | — |
| 10 | — | — | — | 18 | 3 | 3 | — | — | — | — |
| 5 | — | — | — | 20 | 7 | 7 | — | — | — | — |

TABLE X

Transferred resistance levels of some of the *E. coli* J5 and *E. coli* col R strains and levels expressed by *E. coli* ANR

| Resistance level | Sulphadiazine | | Streptomycin | | Tetracyclin | | Chloramphenicol | | Kanamycin | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | *E. coli* J5 or col R | *E. coli* ANR | *E. coli* J5 or col R | *E. coli* ANR | *E. coli* J5 or col R | *E. coli* ANR | *E. coli* J5 or col R | *E. coli* ANR | *E. coli* J5 or col R | *E. coli* ANR |
| 1,000 | 30 | 30 | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 500 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 200 | — | — | — | — | 1 | 1 | 10 | 10 | 4 | 4 |
| 100 | — | — | — | — | 15 | 12 | — | — | — | — |
| 50 | — | — | 2 | 1 | 12 | 11 | — | — | — | — |
| 20 | — | — | 13 | 12 | — | 4 | — | — | — | — |
| 10 | — | — | 4 | 4 | 1 | — | — | — | — | — |
| 5 | — | — | 3 | 6 | 1 | 2 | — | — | — | — |

experiments with a *Salmonella panama* strain carrying 3 R fi⁻ factors. Another possible explanation for the different progenies of recipient cultures would be simply the segregation of the markers belonging to a single R factor. The results obtained with 12 strains (Table VII) may have one or both explanations.

The levels of transferable resistance of the *Shigella* cultures varied according to the drug. For Su it was always higher than 1000 μg/ml, for S it varied from 20-500 μg/ml, for T between 5 and 200 μg/ml, for C between 20 and 200 μg/ml, and for K between 500 and > 1000 μg/ml. No significant differences in levels were found between the transferred and the not transferred resistance with respect to Su and SuS. The resistance levels expressed by the recipient strains of *E. coli* K12 were regularly lower for streptomycin and kanamycin, regularly higher for chloramphenicol and usually very close for tetracyclin. Similar results were obtained by WATSON & PATH [14] for SuSTC. When the resistance received by *E. coli* K12 was transferred to other strains of the same bacteria, the levels found in the latter were almost always identical. These findings confirm the role of the host in the phenotypic expression of resistance [13]. To establish whether the lower levels found in *E. coli* K12 strains were due to an inherent property of the bacteria, conjugation experiments were carried out with a few *Shigella* strains and one *E. coli* 0111 strain, leading to the same results.

Finally, it must be stressed that infectious resistance is very stable in *Shigella* as well as in *Escherichia*, when the culture is considered as a whole.


## RESUMO

*Resistência transferível a drogas dos tipos simples e múltipla em amostras de* Shigella *isoladas de material clínico*

Foram pesquisados fatôres R em 209 amostras de *Shigella* resistentes a uma ou mais das seguintes drogas: Sulfadiazina (Su), Estreptomicina (E), Tetraciclina (T), Cloranfenicol (C) e Kanamicina (K). Êstes elementos foram encontrados em 84 a 100% das amostras SuETCK, SuETC, SuETK, SuTCK, SuET e SuT e em 20,9 a 12% das amostras SuE e Su, respectivamente. Em 13 amostras resistentes a duas ou mais drogas, a transferência da resistência foi parcial, os marcadores não transferidos sendo sempre Su, E ou SuE. Por outro lado, das amostras que transferiram todos os seus mardcadores, 12 deram origem a duas, três e quatro progênies da cultura receptora. Os níveis de resistência expressos pela *E. coli* usada como receptora foram superiores aos presentes nas culturas de *Shigella* quando estas eram resistentes ao C, inferiores quando eram resistentes a E e K e pràticamente iguais quando resistentes a Su e T. Ao contrário, quando se fêz transferência de uma amostra de *E. coli* K12 para outra, os níveis expressos pela última foram semelhantes aos presentes na primeira. Verificou-se no início do trabalho que a maioria das culturas de *Shigella sonnei* deixou de transferir resistência, isto decorrendo da destruição da cultura receptora por colicinas produzidas por elas. O emprêgo posterior de uma mutante de *E. coli* K12 resistente às colicinas produzidas pelas amostras de *Shigella sonnei* fêz com que a freqüência de transferência destas amostras passasse a ser semelhante à das amostras das outras espécies de *Shigella*.



## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo".

We thank Dr. Naomi Datta (Department of Bacteriology, Royal Postgraduate Medical School, London) for providing us with *E. coli* K12 J5 $F^-$ $lac^+$ $pro^+$ $met^+$.


## REFERENCES


1. ABBOTT, J. D. & SHANNON, R. — A method for typing *Shigella sonnei*, using colicins production as a marker. *J. Clin. Path.*, **11**:71-77, 1958.

2. BOUANCHAUD, D. H. & CHABBERT, Y. A. — Stable coexistence of three resistance factors (fi⁻) in *Salmonella panama* and *Escherichia coli* K12. *J. Gen. Microbiol.*, **58**:107-113, 1969.

3. DATTA, N. — Infectious drug resistance. *Brit. Med. Bull.*, **21**:254-259, 1965.

4. DAVIS, B. D. & MINGIOLI, E. S. — Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B12. *J. Bact.*, **60**:17-28, 1950.

5. FERNANDES, M. R. F. & TRABULSI, L. R. — Resistência infecciosa a drogas em bactérias. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo*, **23**:153-160, 1968.

6. HARPER, G. J. & CAWSTON, W. C. — The "in vitro" determination of the sulphona-

mide sensitivity of bacteria. *J. Path. Bact.*, **57**:59-66, 1945.

7. MITSUHASHI, S. — The R factors. *J. Infect. Dis.*, **119**:89-100, 1969.

8. MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; EGAWA, R.; TANAKA, T. & NAGAI, Y. — Drug resistance of enteric bacteria. IX — Distribution of R factors in Gram negative bacteria from clinical sources. *J. Bact.*, **93**: 1242-1245, 1967.

9. ROMEIRO, E. & MEYNELL, E. — Covert fi− R factors in fi+ R+ strains of bacteria. *J. Bact.*, **97**:780-786, 1969.

10. SZTURM-RUBINSTEIN; PIÉCHAUD, D.; BAUDENS, J. G. & TH. FLOCH — Multirésistance des Shigella aux antibiotiques: comparison de sanches selon leur sous-groupes et leur origine. *Ann. Inst. Pasteur*, **117**: 213-221, 1969.

11. TRABULSI, L. R. & ZULIANI, M. E. — Estudos sôbre a *E. coli* 0111:B4. III — Sensibilidade *in vitro* à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **11**:323-334, 1969.

12. WATANABE, T. — Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bact. Rev.*, **27**:87-115, 1963.

13. WATANABE, T. & FUKASAWA, T. — Episome-Mediated transfer of drug resistance in enterobacteriaceae. *J. Bact.*, **81**:679-683, 1961.

14. WATSON, C. E. E. & PATH, M. C. — Infectious drug resistance in *Shigellae* in Cape Town. *South Afr. Med. J.*, **41**:728-731, 1967.

---

Recebido para publicação em 12/4/1970.

*Rev. Microbiol.*
*1(1):13-18, julho-setembro, 1970*

# CRESCIMENTO E VIABILIDADE DE *SALMONELLA* EM DIVERSAS VARIAÇÕES DO MEIO DE RAPPAPORT

Deise Pasetto FALCÃO (1) e I. SUASSUNA (2)

## RESUMO

Fêz-se uma avaliação de seis variações do meio de Rappaport empregando diversas concentrações de cloreto de magnésio, quer na presença ou na ausência do verde malaquita, frente a 30 amostras de *Salmonella* pertencentes a diversos grupos sorológicos.

Verificou-se que a concentração de 3,0% de cloreto de magnésio mostrou-se inibitória para a quase totalidade das amostras estudadas. Observou-se, por outro lado, um efeito inibidor do corante verde malaquita sôbre muitas das amostras estudadas.

A concentração ideal de cloreto de magnésio, para o enriquecimento de salmonelas, seria a de 2,0%, em ausência de verde malaquita.

Acreditamos que RAPPAPORT & col., assim como outros Autores que obtiveram bons resultados com êsse meio não tenham levado em consideração a água de condensação existente no cloreto de magnésio fornecido comercialmente e, assim, utilizaram concentrações abaixo da prescrita. Caso essa hipótese seja válida, a concentração real de cloreto de magnésio incluída no meio original seria de 1,8% e não de 4%.

O comportamento dos diferentes grupos sorológicos de *Salmonella* frente às variações ensaiadas do meio de Rappaport é relatado.

## INTRODUÇÃO

Estudando o efeito da dessecação sôbre diversos grupos de enterobactérias, RAPPAPORT & col. [16], verificaram que os sais de cálcio e magnésio em altas concentrações inibiam *Proteus* e contribuiam para o enriquecimento de *Salmonella*. Verificaram a seguir que, juntando-se um corante bacteriostático ao meio de cultura, com soluções hipertônicas, obtinha-se um meio de enriquecimento que se mostrava superior aos utilizados para enriquecimento de *Salmonella*, com exceção de *Salmonella typhi*.

Alguns Autores, estudando êsse meio adicionado de verde malaquita, confirmaram sua superioridade sôbre outros meios de enriquecimento [1, 3, 9, 10, 11, 18], enquanto outros não obtiveram bons resultados [15, 19].

BANIC [2], estudando um nôvo meio em que foi usado o cloreto de magnésio para enriquecimento de *Salmonella*, observou que a concentração ótima dêsse sal para tal fim era de 3,4% e não de 4%, conforme preconizado por RAPPAPORT & col. [16, 17].

Estudando o meio de Rappaport com culturas puras de enterobactérias observamos [4, 5] que o meio com a concentração de 4% de cloreto de magnésio, que é a indicada pelos proponentes, mostrou-se inibitório para *Sal-*

---

Extrato da tese de doutoramento, apresentada à Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, São Paulo, Brasil

(1) Professor Assistente da Cadeira de Microbiologia da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara, São Paulo, Brasil

(2) Professor de Microbiologia e Imunologia. Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro e Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado da Guanabara, Brasil

*monella typhimurium*, a qual foi inibida já à concentração de 3,5%. Em relação à *Salmonella typhi* o efeito inibidor surgiu a partir da concentração de 3%. Verificamos ainda que o verde malaquita na concentração indicada, demonstrou capacidade de inibição do crescimento para tôdas as espécies testadas, com exceção de *Salmonella typhimurium* e *Enterobacter*.

No presente estudo um número maior de amostras de *Salmonella*, de diferentes grupos sorológicos, é examinado em relação a variadas concentrações de cloreto de magnésio, em ausência e presença de verde de malaquita, compondo-se seis variações do meio proposto em relação aos dois ítens mencionados.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Meio de Rappaport

| | |
|---|---|
| Solução A | 100 ml |
| Solução B | 10 ml |
| Solução C | 3 ml |

*Solução A*

| | |
|---|---|
| Bacto Tryptone | 0,5 g |
| NaCL | 0,8 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,16 g |
| Água bidestilada | 100 ml |

*Solução B*

| | |
|---|---|
| $MgCl_2$ | 40 g |
| Água destilada | 100 ml |

*Solução C*

| | |
|---|---|
| Verde malaquita | 0,4 g |
| Água destilada | 100 ml |

### Modificação do meio de Rappaport

*Variação 1*

| | |
|---|---|
| Solução A | 100 ml |
| Solução de $MgCl_2.6H_2O$ a 20% | 10 ml |

*Variação 2*

| | |
|---|---|
| Solução A | 100 ml |
| Solução de $MgCl_2.6H_2O$ a 25% | 10 ml |

*Variação 3*

| | |
|---|---|
| Solução A | 100 ml |
| Solução de $MgCl_2.6H_2O$ a 30% | 10 ml |

*Variação 4*

| | |
|---|---|
| Solução A | 100 ml |
| Solução de $MgCl_2.6H_2O$ a 20% | 10 ml |
| Solução C | 3 ml |

*Variação 5*

| | |
|---|---|
| Solução A | 100 ml |
| Solução de $MgCl_2.6H_2O$ a 25% | 10 ml |
| Solução C | 3 ml |

*Variação 6*

| | |
|---|---|
| Solução A | 100 ml |
| Solução de $MgCl_2.6H_2O$ a 30% | 10 ml |
| Solução C | 3 ml |

A solução A foi preparada de acôrdo com a fórmula original com o pH potenciomètricamente ajustado a 6,8. Era a seguir filtrada em papel e esterilizada por autoclavação a 120°C por 20 minutos.

As diferentes soluções de cloreto de magnésio foram preparadas a partir do sal (Merck) com 6 moléculas de água de condensação. O pêso molecular da água foi considerado para o preparo das soluções de diferentes concentrações. As soluções tiveram seu pH ajustado também a 6,8, com o auxílio de potenciômetro. A seguir, eram filtradas em papel e esterilizadas por autoclavação a 120°C por 20 minutos.

A solução de verde malaquita foi preparada a partir do corante (Merck), filtrada em papel e esterilizada por autoclavagem a 120°C por 20 minutos.

As soluções A, B e C eram assèpticamente misturadas e distribuídas em volumes de 5 ml por tubo. Antes do uso, os tubos eram conservados no refrigerador à temperatura de 4°C, durante o máximo de uma semana.

*Amostras de Salmonella* — As amostras estudadas, num total de 30, pertencentes a diferentes grupos sorológicos do esquema de Kauffmann-White, pertencem à coleção de culturas do Laboratório de Enterobactérias, do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, e correspondem aos seguintes sorotipos: grupo A: *S. paratyphi A* var. *durazzo;* grupo B: *S. paratyphi B* var. *java, S. typhimurium, S. budapest, S. sandiego;* grupo $C_1$: *S. montevideo, S. paratyphi;* $C_2$: *S. bovis-morbificans;* grupo D: *S. typhi, S. gallinarum, S. pullorum, S. berta, S. eastbourne;* grupo $E_1$: *S.*

*muenster, S. zanzibar, S. uganda, S. lexington, S. meleagridis, S. anatum;* grupo $E_2$: *S. newington;* grupo F: *S. aberdeen, S. rubislaw;* grupo $G_2$: *S. havana;* grupo H: *S. carrau;* grupo I: *S. hvittingfoss, S. gaminara;* grupo J: *S. kirkee;* grupo L: *S. minnesota;* grupo M: *S. tel-aviv;* grupo N: *S. urbana.*

*Avaliação das variações do Meio de Enriquecimento de Rappaport* — Para cada uma das 30 amostras adotou-se o seguinte procedimento: a partir de cultura com 24 horas, em caldo simples, eram feitas diluições em solução salina a 0,85%, na razão de ordem 10 ($10^{-1}$ a $10^{-8}$).

De cada uma das diluições retirava-se 0,1 ml, diluia-se em 5 ml de salina e semeava-se 0,1 ml em cada uma das seis variantes do meio de Rappaport. Do tubo com a suspensão do germe em salina retirava-se, logo a seguir, 0,1 ml e semeava-se em placa contendo Ágar-Eosina — Azul de Metileno ("EMB-Agar", Difco). As placas eram incubadas durante 24 horas a 37°C e a seguir procedia-se à contagem do número de germes existentes no inóculo.

Os tubos contendo as variações do meio de Rappaport e semeados com as diferentes diluições eram também incubados durante 24 horas a 37°C. Posteriormente, retirava-se 0,1 ml de cada um e semeava-se em placas com EMB-Agar (Difco), como já descrito para a contagem do número de colônias, a fim de saber-se o número de germes existentes após a passagem nos meios de enriquecimento.

## RESULTADOS

O resultado do comportamento dos 30 tipos sorológicos de *Salmonella* nas seis variações do meio de Rappaport é apresentado na Tabela I. Observa-se que nas fórmulas 3 e 6, poucos são os tipos aos quais corresponde um enriquecimento. Assim, das 30 amostras sòmente a *S. typhimurium* e *S. zanzibar* foram enriquecidas nesses meios enquanto *S. paratyphi B* na variação 6 e *S. urbana* na variação 3, permaneceram com número inalterado. A *S. kirkee*, na variação 3 mostrou enriquecimento, enquanto *S. gallinarum* na variação 6, cresceu apenas ligeiramente.

Empregando as variações 2 e 5, observamos o enriquecimento em número, das seguintes amostras: *S. paratyphi B, S. bovismorbificans, S. gallinarum, S. zanzibar, S. hvittingfoss, S. typhimurium, S. carrau, S. uganda, S. tel-aviv, S. meleagridis, S. lexington, S. gaminara, S. havana, S. montevideo, S. sandiego, S. berta, S. rubislaw* e *S. minnesota.*

No meio com 2,5% de cloreto de magnésio e em ausência de verde malaquita (variação 2), houve enriquecimento, além das amostras acima mencionadas, de *S. anatum, S. aberdeen, S. newington, S. paratyphi A, S. budapest, S. eastbourne, S. kirkee* e *S. urbana.*

Quase todos os germes foram enriquecidos quando semeados nas variações 1 e 4. Constituem exceções as amostras de *S. pullorum, S. aberdeen, S. newington, S. typhi, S. kirkee,* e *S. urbana,* que foram inibidas na variação 4, e as amostras de *S. muenster,* e *S. paratyphi C,* que foram inibidas nas duas variações (1 e 4).

Verificando a percentagem das amostras enriquecidas nas diferentes variações observa-se o seguinte: na variação 1, foram enriquecidas 93,5% das amostras; na variação 2, 90,0% das amostras; na variação 3, 10,0%; na variação 4, 73,3%; na variação 5, 60,0% e na variação 6, 10,0% das amostras. Êsses dados estão gràficamente representados na Fig. 1.

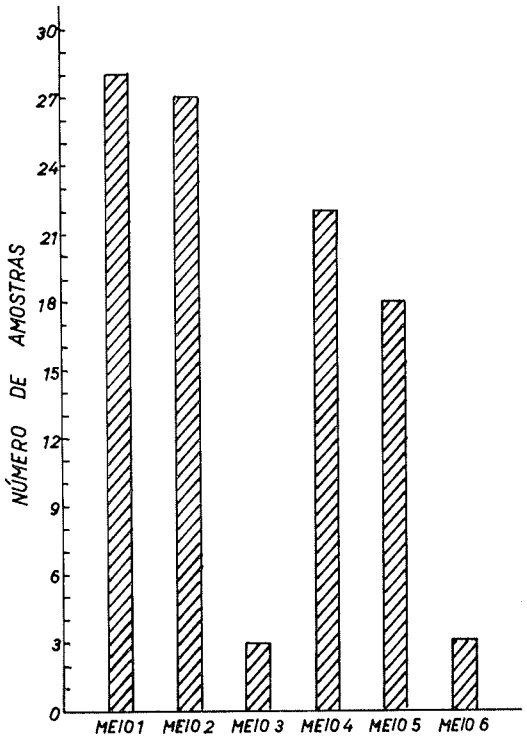



Fig. 1 — Proporção relativa do crescimento de 30 amostras de *Salmonella* em seis variações do meio de RAPPAPORT

TABELA I

Comportamento de amostras de *Salmonella* frente a variações do meio de Rappaport

| Amostra n.º | Sorotipo | Contagem do número de colônias em | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Salina | var. n.º 1 | var. n.º 2 | var. n.º 3 | var. n.º 4 | var. n.º 5 | var. n.º 6 |
| 2 | *S. paratyphi* A | $68x10^6$ | > $500x10^8$ | $122x10^8$ | $122x10^2$ | > $300x10^8$ | $78x10^3$ | $42x10^2$ |
| 5 | *S. paratyphi* B | $116x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $84x10^3$ | > $500x10^8$ | $115x10^8$ | $120x10^7$ |
| 10 | *S. typhimurium* | $150x10^8$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | > $300x10^8$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | > $300x10^8$ |
| 23 | *S. budapest* | $150x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $60x10^3$ | > $500x10^8$ | > $300x10^5$ | $9x10^1$ |
| 18 | *S. sandiego* | $67x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $33x10^2$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $12x10^1$ |
| 114 | *S. montevideo* | $47x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $76x10^2$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $52x10^2$ |
| 32 | *S. paratyphi* C | $94x10^6$ | $9x10^1$ | $17x10^1$ | $102x10^1$ | $112x10^1$ | $53x10^2$ | 0 |
| 48 | *S. bovis-morbificans* | $85x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $28x10^2$ | > $500x10^8$ | > $300x10^8$ | $49x10^1$ |
| 56 | *S. typhi* | $82x10^4$ | > $300x10^5$ | $152x10^5$ | $68x10^2$ | $188x10^3$ | $158x10^3$ | $79x10^3$ |
| 143 | *S. gallinarum* | $41x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $53x10^3$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $50x10^7$ |
| 317 | *S. pullorum* | $180x10^5$ | $146x10^6$ | $81x10^2$ | $30x10^1$ | $54x10^3$ | $57x10^3$ | $33x10^1$ |
| 60 | *S. berta* | $78x10^6$ | > $500x10^8$ | > $300x10^8$ | $36x10^2$ | > $500x10^8$ | $115x10^8$ | $300x10^1$ |
| 61 | *S. eastbourne* | $76x10^5$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $225x10^1$ | $66x10^6$ | $53x10^4$ | $5x10^1$ |
| 68 | *S. muenster* | $58x10^5$ | $31x10^3$ | $8x10^1$ | 0 | $3x10^1$ | $2x10^1$ | 0 |
| 70 | *S. zanzibar* | $60x10^7$ | var. n.º 1 | > $500x10^8$ | $250x10^8$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | > $300x10^8$ |
| 89 | *S. uganda* | $57x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $300x10^1$ | > $500x10^8$ | $175x10^8$ | $1x10^1$ |
| 102 | *S. lexington* | $49x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $61x10^2$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $45x10^5$ |
| 96 | *S. meleagridis* | $69x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $30x10^2$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $61x10^1$ |
| 67 | *S. anatum* | $60x10^6$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $63x10^5$ | > $300x10^8$ | $230x10^3$ | $51x10^2$ |
| 72 | *S. newington* | $120x10^6$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | > $300x10^1$ | $193x10^1$ | $80x10^2$ | $6x10^1$ |
| 78 | *S. aberdeen* | $85x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | > $300x10^1$ | $77x10^2$ | $100x10^1$ | $47x10^1$ |
| 90 | *S. rubislaw* | $48x10^6$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | > $300x10^2$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $30x10^6$ |
| 101 | *S. havana* | $220x10^6$ | > $500x10^8$ | $136x10^8$ | $78x10^2$ | > $500x10^8$ | $61x10^8$ | $181x10^1$ |
| 81 | *S. carrau* | $105x10^5$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $44x10^2$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $30x10^2$ |
| 83 | *S. hvittingfoss* | $60x10^5$ | > $500x10^8$ | > $300x10^8$ | $82x10^3$ | > $500x10^8$ | $250x10^8$ | $63x10^3$ |
| 84 | *S. gaminara* | $120x10^6$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $100x10^5$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $150x10^5$ |
| 94 | *S. tel-aviv* | $55x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $48x10^3$ | > $500x10^8$ | $280x10^8$ | $106x10^6$ |
| 87 | *S. minnesota* | $65x10^5$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $108x10^2$ | > $500x10^8$ | $126x10^5$ | $60x10^2$ |
| 85 | *S. kirkee* | $56x10^6$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | > $300x10^8$ | $59x10^2$ | $79x10^2$ | $8x10^1$ |
| 103 | *S. urbana* | $74x10^7$ | > $500x10^8$ | > $500x10^8$ | $70x10^7$ | 0 | $8x10^1$ | 0 |

## DISCUSSÃO

Os dados apresentados vêm comprovar os resultados anteriores de FALCÃO & col. [4, 5], de que a concentração de 4% de cloreto de magnésio é excessiva para salmonelas, pois mesmo com a concentração de 3%, poucas foram as amostras capazes de crescimento, quer na presença, quer na ausência de verde malaquita. Verificamos por outro lado o efeito inibidor do corante sôbre muitas das amostras de *Salmonella* estudadas.

A concentração ideal para o enriquecimento dêsses germes seria a de 2%, na ausência de verde malaquita. Em tal concentração, porém, êsse meio não serviria como inibidor de outras enterobactérias constituintes da flora fecal, principalmente na ausência do corante, conforme comprovamos anteriormente [4, 5].

Como dissemos, outros Autores conseguiram bons resultados com a concentração de 4% de cloreto de magnésio [1, 3, 11]. Êsse sal usualmente apresenta-se no comércio com 6 moléculas de água de condensação [6, 7, 8, 12, 13, 14]. Entretanto RAPPAPORT & col., ao descreverem seu meio, bem como os outros Autores acima mencionados, não fizeram qualquer referência à hidratação no sal utilizado, indicando apenas que a solução de cloreto de magnésio foi preparada pela adição de 40 g de $MgCl_2$ em 100 ml de água destilada. Acreditamos que o sal empregado pelos mesmos incluia as moléculas de água, mas que as mesmas não foram consideradas no preparo da solução a 40%. Caso tal hipótese seja válida, a concentração final seria de 1,8%, e não de 4%.

HOOPER & JENKINS [9], estudando êsse meio, verificaram sua eficácia para o isolamento de salmonelas, mas referem-se à alteração de concentração, dizendo que ao dissolver 40 g de sal de magnésio em 100 ml de água, o volume final da solução corresponde a 120 ml, dando a concentração de 33,3%. Como o meio completo contém 10 ml dessa solução em 100 ml, a concentração final de cloreto de magnésio no meio, passaria para 2,9%, não sendo, portanto, de 4% conforme indicação do trabalho original.

Nos trabalhos de STUART & PIVINICK [18] e de IVESON & KOVACS [10], os Autores afirmam ter trabalhado com sal hidratado. Como empregaram 40 g dêsse sal em 100 ml de água, tiveram do ingrediente básico uma concentração real menor.

Acreditamos que os outros Autores que não conseguiram bons resultados com o meio de RAPPAPORT [15, 19], assim como nós mesmos [4, 5], em todos os casos trabalharam com solução de cloreto de magnésio com a concentração corrigida em relação à água de condensação.

Temos ainda a acrescentar que as concentrações de 2,0%, 2,5%, 3,0%, 3,5% e 4,0% de cloreto de magnésio, correspondem na realidade a 1,8%, 2,2%, 2,7%, 3,1% e 3,6%, porque o volume final do meio, após juntar as soluções A, B e C corresponde a 113 ml e não a 100 ml.

Através dos presentes resultados verificamos que não há perfeita concordância de comportamento entre grupos e tipos sorológicos de salmonela frente às 6 variações do meio de Rappaport. Assim, das quatro amostras pertencentes ao grupo B, *S. typhimurium* foi enriquecida nas 6 variações, *S. paratyphi B* e *Salmonella sandiego* nas variações 1, 2, 4 e 5, enquanto *Salmonella budapest* apenas nas variações 1, 2 e 4.

Estudamos duas amostras pertencentes ao grupo $C_1$ e verificamos que a amostra de *Salmonella montevideo* foi enriquecida nas variações 1, 2, 4 e 5, enquanto a amostra de *Salmonella paratyphi C* foi inibida nas seis variações.

Para amostras do grupo D, utilizamos *S. gallinarum, S. berta, S. eastbourne, S. pullorum* e *S. typhi.* A primeira foi enriquecida nas variações 1, 2, 4, 5 e na variação 6 manteve-se pràticamente inalterada. A segunda foi enriquecida nas variações 1, 2, 4 e 5. A terceira nas variações 1, 2 e 4. A amostra de *S. pullorum* só mostrou enriquecimento na variação 1, enquanto *S. typhi* nas variações 1 e 2.

Em relação às amostras do grupo E, houve também diversificação de comportamento. Assim, a amostra de *S. zanzibar* foi enriquecida nas 6 variações e *S. muenster,* ao contrário, inibida nas 6. *S. lexington, S. meleagridis* e *S. uganda* sofreram enriquecimento diante das variações 1, 2, 4 e 5. A amostra de *S. anatum* foi enriquecida sòmente com as variações 1, 2 e 4, e a amostra de *S. newington* nas variações 1 e 2. Em relação às salmonelas pertencentes a êsse grupo há discordância entre os Autores que trabalharam com êsse meio. Assim, COLLARD & UNWIN [3], disseram ser êle inferior aos meios de selenito e tetrationato para o isolamento de salmonelas do grupo sorológico E, com o que discordam IVESON & col.[11] e ANDERSON & KENNEDY [1].

Em relação às amostras do grupo F, verificamos que a amostra de *S. aberdeen* foi enriquecida nas variações 1 e 2, e *S. rubislaw*, nas variações 1, 2, 4 e 5.

Estudamos duas amostras do grupo I, *Salmonella hvittingfoss* e *Salmonella gaminara*, sendo que as duas apresentaram o mesmo comportamento, isto é, foram enriquecidas quando semeadas nas variações 1, 2, 4 e 5.


## SUMMARY

*Growth and viability of* Salmonella *in several modifications of the* RAPPAPORT *culture medium*

The potentialities of Rappaport's medium as a selective growth medium for *Salmonella* organisms was investigated by varying the original magnesium chloride and malachite green concentrations in relation to 30 strains of *Salmonella* of different serotypes.

Three per cent magnesium chloride salt concentration was inhibitory for most strains tested, and malachite green, in the original concentration similarly suppressed growth of many serotypes. Only 2.0 per cent magnesium chloride in the absence of malachite green would not suppress growth of the *Salmonella* strains. In fact, when a solution is prepared with the magnesium chloride salt, usually available in the market, which is hydrated with six water molecules, the 4.0 per cent weight/volume solution of the original salt corresponds actually to only 1.8 per cent of magnesium chloride which, perhaps, would explain some discrepancies in the literature dealing with the use of Rappaport's medium.

In relation to each variation of Rappaport's medium tested, the behaviour of the main serogroups of *Salmonella* was discussed.


## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. ANDERSON, K. & KENNEDY, H. — Comparison of selective media for the isolation of *Salmonellae*. *J. Clin. Path.*, **18**:747-749, 1965.

2. BANIC, S. — A new enrichment medium for *Salmonellae*. *J. Hyg.*, **62**:25-28, 1964.

3. COLLARD, P. & UNWIN, M. — A trial of Rappaport's medium. *J. Clin. Path.*, **11**:426-427, 1958.

4. FALCÃO, D. P.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Comportamento de algumas enterobactérias no meio de Rappaport, com referência especial a *Shigella*. *Ciência & Cultura*, **19**:457-458, 1967.

5. FALCÃO, D. P.; SUASSUNA, I. & SUASSUNA, I. R. — Avaliação do poder seletivo do meio de Rappaport para diversas espécies de enterobactérias. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, **3**:129-136, 1969.

6. FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL — 2.ª ed. São Paulo, Gráfica Siqueira, 1959, pág. 1071.

7. HANDBOOK OF CHEMISTRY — 10th ed. New York, McGraw-Hill, 1961, pág. 226.

8. HANDBOOK OF CHEMISTRY AND PHYSICS — 46th ed. Cleveland, Chemical Rubber, 1965-1966, pág. 190.

9. HOOPER, W. L. & JENKINS, H. R. — An evaluation of Rappaport's magnesium chloride/malachite green medium in the routine examination of faeces. *J. Hyg.*, **63**:491-495, 1965.

10. IVESON, J. B. & KOVACS, N. — A comparative trial of Rappaport's enrichment medium for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *J. Clin. Path.*, **20**:290-293, 1967.

11. IVESON, J. B.; KOVAC, N. & LAURIE, W. — An improved method of isolating *Salmonellae* from contaminated diseccated coconut. *J. Clin. Path.*, **17**:75-78, 1964.

12. MERK INDEX OF CHEMICALS AND DRUGS — 7th ed. Merk, 1960, pág. 626.

13. PHARMACOPEE FRANÇAISE — 8eme ed. Paris, 1965, pág. 1709.

14. PHARMACOPEIA OF THE UNITED STATES OF AMERICA — 16th revision. Easton, Mack Publishing, 1960, pág. 1002.

15. RAJ, H. — Enrichment medium for selection of *Salmonella* from fish homogenate. *Appl. Microbiol.*, **14**:12-20, 1966.

16. RAPPAPORT, F.; KONFORT, N. & NAVON, B. — A new enrichment medium for certain *Salmonellae*. *J. Clin. Path.*, **9**: 261-266, 1956.

17. RAPPAPORT, F.; SKARITON-LOWENTHAL, M. & OLITZKI, A. L. — A culture medium for the enrichment of *Salmonellae* and growth inhibition of *Proteus*. *Bull. Res. Counc. Israel*, **2**:448-449, 1953.

18. STUART, P. E. & PIVINICK, H. — Isolation of *Salmonellae* by selective motility systems. *Appl. Microbiol.*, **13**:365-372, 1965.

19. ZAJAC-SATLER, J. & BANIC, S. — Efficacy of different selective media for the isolation of *Salmonellae* from faeces. *J. Clin. Path.*, **18**:750-751, 1965.


---

Recebido para publicação em 17/4/1970.

*Rev. Microbiol.*
*1(1):19-24, julho-setembro, 1970*

# PESQUISA DE AGLUTININAS ANTI-LEPTOSPIRA EM SOROS DE TRABALHADORES DE DIVERSAS PROFISSÕES

C. A. SANTA ROSA [1], A. L. COSCINA [2], A. F. Pestana de CASTRO [1], A. S. da SILVA [1] e J. C. QUEIROZ [1]

## RESUMO

Nêste trabalho foram examinadas 1.766 amostras de soros humanos assim distribuídas: 317 soros de trabalhadores do serviço de limpeza urbana da cidade de São Paulo, 172 funcionários do Departamento de Águas e Esgotos (DAE) da mesma cidade e 1.277 trabalhadores de campo.

Dos 317 empregados da limpeza urbana, 128 trabalhavam diretamente na coleta de lixo, 66 na limpeza de bueiros e 21 na limpeza de córregos e galerias pluviais. Os restantes eram funcionários de escritório, fiscais, motoristas, etc., sem nenhum contato com lixo ou águas poluídas. Nos 172 empregados do DAE, 147 estavam em contato com esgotos ou águas poluídas e os demais eram mecânicos, auxiliares de pedreiro, etc. Entre os 1.277 trabalhadores rurais, 60 trabalhavam em fazendas de criação dos quais 16 ordenhadores, dois ajudantes de ordenha, um faxineiro de estábulo, um administrador e 40 tratadores de suínos.

Os restantes 1.217 haviam trabalhado ou ainda trabalhavam no plantio e colheita de diversas culturas principalmente canaviais.

Foi usado como método sorológico a soroaglutinação microscópica e como antígenos 22 sorotipos de leptospira, culturas vivas entre os 4.º e 7.º dias de crescimento. Como título final na soroaglutinação foi considerada a mais alta diluição de sôro que em contato com o antígeno mostrou 50% de leptospiras aglutinadas.

Os resultados do teste se acham nas Tabelas I e II.

## INTRODUÇÃO

As leptospiroses humanas em geral estão associadas a circunstâncias ou ocupações nas quais o indivíduo teve contato com leptospiras diretamente pela urina de ratos ou outros animais domésticos e silvestres ou indiretamente através da água ou solo úmido contaminados. É sabido que a leptospirose está relacionada entre as doenças ocupacionais. Os veterinários, os magarefes, trabalhadores das rêdes de esgotos, minas de carvão, estão entre os profissionais mais sujeitos a infecção por leptospiras. O contato direto com animais domésticos também traz o mesmo risco seja no caso dos empregados em fazendas de criação, ordenhadores, tratadores de animais ou nos marchantes e magarefes já citados ou em todos aquêles que têm contato com carcassas de animais nos abatedouros. Há outras profissões, porém, como a de pedreiro, que em certas circunstâncias podem envolver riscos de infecção por leptospiras. Trabalhadores de campo, em arrozais, em canaviais e mesmo em hortas podem também estar sujeitos à leptospirose. Na literatura internacional são muitas as citações de casos de doença de Weil associados à atividade profissional dos pacientes [1, 3, 11, 15, 16, 17, 18]. Os inquéritos sorológicos, com a finalidade de verificar anticorpos específicos para leptospiras em diferentes grupos ocupa-

(1) Do Instituto Biológico de São Paulo, Brasil
(2) Do Hospital do Servidor Público Estadual, São Paulo, Brasil

cionais são, entretanto, relativamente poucos. JUNGK [10], examinando 160 trabalhadores de canais em Berlim, encontrou oito casos positivos para *icterohaemorrhagiae* (5%) e um caso para *grippotyphosa* (0,6%). FUCHS [6], examinando o sôro de 487 indivíduos considerados por êle como trabalhadores em "profissões sujas" e em minas de carvão, encontrou 14 casos positivos para *icterohemorrhagiae* (3,2%) assim discriminados: 4,9% entre os trabalhadores de esgotos; 7,4% entre os lixeiros e 0,9% entre os varredores de ruas. Nos Estados Unidos, MILLER [14], em uma investigação sorológica em 288 soros de trabalhadores de campo (fazendas de gado leiteiro e de corte) encontrou uma incidência de 2,9% nos dois grupos ocupacionais. No Brasil, CORRÊA & col. [4] examinando 403 indivíduos dos quais 316 trabalhavam na época em coleta de lixo, registraram uma taxa global de 2,97% de positividade. Na maioria dos casos o sorotipo envolvido foi *icterohaemorrhagiae*. MAGALDI [12], examinando soros de 200 funcionários trabalhadores da rêde de esgotos de São Paulo, encontrou 28,5% de positividade para diversos sorotipos de leptospiras. Outros inquéritos já foram realizados no Brasil entre pessoas de diversas grupos profissionais ou que pelo seu modo de vida pudessem contrair a infecção por leptospiras [2, 8, 9, 13].

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidos cêrca de 5 ml de sangue de cada indivíduo, tendo sido examinado um total de 1.766 amostras assim ditribuídas: 317 soros de trabalhadores do Setor de limpeza pública da Prefeitura da cidade de São Paulo, 172 soros de funcionários do Departamento de Águas e Esgotos (DAE) na mesma cidade e 1.277 soros de trabalhadores de campo. Dos 317 empregados da limpeza pública, 128 trabalhavam diretamente na coleta de lixo, 66 na limpeza de bueiros e 21 na limpeza de córregos. Os 102 restantes trabalhavam como auxiliar de escritório, cozinheiro ou auxiliar de cozinha, fiscais, motoristas, enfermeiro, etc. Não tinham, portanto, nenhum contato com lixo ou águas poluídas.

No grupo dos trabalhadores do DAE, 147 estavam em contato direto com esgotos ou águas poluídas, seis eram mecânicos, três pintores, seis auxiliares de pedreiro e 10 funcionários de escritório.

Dos trabalhadores de campo, 60 eram ocupados em fazendas de criação dos quais 16 ordenhadores, dois ajudantes de ordenha, um faxineiro de estábulo, um administrador e 40 tratadores de suínos; os 1.217 restantes eram trabalhadores em plantio e colheita de diversas culturas, principalmente canaviais.

O método usado nêste trabalho foi o da soroaglutinação microscópica em campo escuro, segundo GALTON [7] sendo que aqui os soros foram diluídos de 1/200 até 1/6.400 tendo-se como antígenos culturas vivas de leptospiras, em meio de Korthoff, cultivadas a 28°C e usadas entre o 4.° e o 7.° dias de crescimento. Os soros foram diluídos inicialmente a 1/100 em solução fisiológica. Com a adição dos antígenos, em volumes iguais de sôro: antígeno, esta diluição passou a ser 1/200. As amostras que foram positivas nesta diluição foram posteriormente testadas em diluições maiores, à razão de dois.

Nêste experimento a bateria de antígenos foi composta de 22 sorotipos a saber:

| | Sorotipo | Amostra |
|---|---|---|
| 1 — | *icterohaemorrhagiae* | RGA |
| 2 — | *canicola* | Hond Utrecht |
| 3 — | *pomona* | Pomona |
| 4 — | *grippotyphosa* | Moskva V |
| 5 — | *guidae* | RP 29 |
| 6 — | *sejroe* | M 84 |
| 7 — | *australis* | Ballico |
| 8 — | *bataviae* | Van Tienen |
| 9 — | *szwajizak* | Szwajizak |
| 10 — | *ballum* | Mus 127 |
| 11 — | *wolffi* | 3705 |
| 12 — | *panama* | Panama |
| 13 — | *hebdomadis* | Hebdomadis |
| 14 — | *cynopteri* | 3522 C |
| 15 — | *sentot* | Sentot |
| 16 — | *pyrogenis* | Salinem |
| 17 — | *saxkoebing* | Mus 24 |
| 18 — | *javanica* | Veldrat Bat. 46 |
| 19 — | *poi* | Poi |
| 20 — | *autumnalis* | Akiyami A |
| 21 — | *djasiman* | Djasiman |
| 22 — | *andamana* | CH 11. |

Como título final foi considerada a mais alta diluição do sôro que em contato com o antígeno mostrou uma reação de duas cruzes, ou seja, 50% de leptospiras aglutinadas por campo.

## RESULTADOS

Um total de 1.766 soros humanos, em três grupos ocupacionais diferentes foi examinado. A Tabela I mostra o número de soros positivos em cada grupo e a respectiva percentagem. Os resultados detalhados dos testes de soroaglutinação mostram na Tabela II que no grupo de trabalhadores da limpeza urbana 31 amostras (9,7%) dentre 317 examinadas foram positivas. Nêste grupo o título de 1/200 foi o mais freqüente, encontrado em nove sorotipos diferentes: *icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa, australis, wolffi, cynopteri, saxkoebing, poi* e *andamana.* Quatro soros reagiram ao título de 1/400 com os sorotipos *icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, pyrogenis* e *poi;* apenas um sôro reagiu a 1/800, o que se deu com o sorotipo *poi* e também um só para o título de 1/1.600 com o sorotipo *icterohaemorrhagiae.*

TABELA I

Números de soros positivos em cada grupo com respectiva percentagem

| Ocupação | N.º de soros examinados | N.º de soros positivos | % |
|---|---|---|---|
| Trabalhadores da limpeza pública | 317 | 31 | 9,7 |
| Trabalhadores na rêde de esgotos | 172 | 1 | 0,5 |
| Trabalhadores de campo | 1.277 | 69 | 5,4 |
| Total | 1.766 | 101 | 5,7 |

No grupo de trabalhadores da rêde de esgotos (DAE) apenas um (0,5%) sôro foi positivo dentre os 172 examinados; o sorotipo em aprêço foi *poi.*

E finalmente, no grupo de trabalhadores de campo 69 amostras (5,4%) dentre 1.277, foram positivas, sendo ainda o título de 1/200 o mais freqüente e notado em quatro sorotipos diferentes: *canicola, grippotyphosa, pomona* e *bataviae.* Duas amostras reagiram ao título de 1/400 para o sorotipo *grippotyphosa,* enquanto 22 reagiram a 1/800 sendo 16 para *icterohaemorrhagiae,* 2 para *canicola,* 2 para *pomona* e 2 para *sejroe;* nêste grupo apenas um sôro reagiu ao título de 1/1.600, o que se deu para o sorotipo *sejroe.*

## DISCUSSÃO

A maioria das leptospiroses humanas tem origem em água contaminada ou objetos úmidos contaminados com a urina de animais portadores. Inúmeros são os trabalhos de pesquisa mostrando que roedores, marsupiais e outras espécies silvestres são reservatórios de leptospiras. Animais domésticos também são hoje reconhecidos como disseminadores de leptospiras patogênicas, se bem que temporàriamente. E a urina do homem infetado pode, por acaso, ser também disseminadora da doença [19].

Pelos resultados obtidos fica mais uma vez evidente que também aqui no Brasil a leptospirose ocorre entre as diversas profissões estudadas.

No primeiro grupo de trabalhadores examinados, o da limpeza pública, com 31 reações positivas, encontrou-se a maior percentagem, 9,7%. Nêle estavam indivíduos que coletavam o lixo da cidade, tendo, portanto, contato com tôda sorte de restos de materiais de diversas origens, embora sua exposição fôsse relativa, pois usam luvas e calçados. Todos os soros que aglutinaram para o sorotipo *poi* provinham de indivíduos em tais condições e que trabalhavam na coleta de lixo pelo menos há um ano e anteriormente haviam trabalhado como operários de fábricas diversas ou ajudantes de caminhão, sendo que um dêles trabalhara na lavoura. Como antecedentes patológicos alguns dentre êles declararam apenas gripes. Dos soros que aglutinaram para *icterohaemorrhagiae* três eram de trabalhadores em desobstrução de bueiros e limpeza de córregos, um trabalhava na limpeza interna e o outro era motorista. Dêles, apenas um declarou ter tido há algum tempo uma intoxicação. Foi o que anteriormente trabalhara em uma metalúrgica e cujo sôro aglutinou com o título mais elevado, 1/1.600. Os dois soros que aglutinaram para o sorotipo *canícola* eram de trabalhadores da limpeza de córregos. Quatro soros aglutinaram para *grippotyphosa;* três eram de trabalhadores na limpeza de bueiros, há apenas seis meses, um dêles com antecedentes ictéricos e o outro era de trabalhador na coleta de lixo pròpriamente dita. Outros sorotipos tais como *pyrogenis, australis, cynopteri* e *saxkoebing* foram encontrados, em soros de trabalhadores em limpeza de bueiros e sem antecedentes que lembrassem leptospirose. Dêstes sorotipos, *pyrogenis* e *saxkoebing* já haviam sido detectados em soros humanos em trabalhos anteriores [9, 12, 13]. Deve-se ressaltar também o achado de 5 amos-

TABELA II

Reações sorológicas nos três grupos estudados

| Sorotipos | Trabalhadores da limpeza pública (317 amostras) | | | | Trabalhadores da rêde de esgotos (172 amostras) | | | | Trabalhadores de campo (1277 amostras) | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Títulos | | | | Títulos | | | | Títulos | | | |
| | 200 | 400 | 800 | 1.600 | 200 | 400 | 800 | 1.600 | 200 | 400 | 800 | 1.600 |
| *Icterohaemorrhagiae* | 3 | 1 | | 1 | | | | | | | 16 | |
| *canicola* | 2 | | | | | | | | 25 | | 2 | |
| *pomona* | | | | | | | | | 11 | | 2 | |
| *grippotyphosa* | 3 | 1 | | | | | | | 7 | 2 | | |
| *guidae* | | | | | | | | | | | | |
| *sejroe* | | | | | | | | | | | | |
| *australis* | 1 | | | | | | | | 1 | | 2 | 1 |
| *bataviae* | | | | | | | | | | | | |
| *szwajizak* | | | | | | | | | | | | |
| *ballum* | | | | | | | | | | | | |
| *wolffi* | 1 | | | | | | | | | | | |
| *panama* | | | | | | | | | | | | |
| *hebdomadis* | | | | | | | | | | | | |
| *cynopteri* | 2 | | | | | | | | | | | |
| *sentot* | | | | | | | | | | | | |
| *pyrogenis* | | 1 | | | | | | | | | | |
| *saxkoebing* | 2 | | | | | | | | | | | |
| *javanica* | | | | | | | | | | | | |
| *poi* | 6 | 1 | 1 | | 1 | | | | | | | |
| *autumnalis* | | | | | | | | | | | | |
| *djasiman* | | | | | | | | | | | | |
| *andamana* | 5 | | | | | | | | | | | |
| Total | 31 (9,7%) | | | | 1 (0,5%) | | | | 69 (5,4%) | | | |

tras de sôro de trabalhadores em limpeza de bueiros, aglutinando para o sorotipo *andamana*, pelo fato de CORRÊA & col. [5] já haverem isolado tal sorotipo em um caso humano fatal num hospital de São Paulo.

No grupo de trabalhadores da rêde de esgotos (DAE) apenas um sôro foi positivo. Tal fato chamou a atenção dos Autores pois MAGALDI [12] havia encontrado anteriormente em grupo semelhante a taxa de 28,5%. Seria de se esperar, pois, que nêste trabalho se encontrasse uma taxa que pelo menos se aproximasse àquela, levando-se em consideração que 147 daqueles trabalhadores estavam em contato direto com esgotos.

O terceiro grupo estudado, ou seja, o de trabalhadores no campo deu 69 (5,4%) reações positivas. Foram encontrados anticorpos para os sorotipos *canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, pomona, sejroe e bataviae*. Dêstes sorotipos apenas um já havia sido relatado nêste tipo de trabalhadores em levantamento feito por HYAKUTAKE & col. [9]. Nêste grupo os resultados foram mais coerentes com a função dos indivíduos, que no anterior. Assim, no sôro de dois ordenhadores foram encontrados anticorpos para *canicola* ao título de 1/800 e no do administrador de uma fazenda, anticorpos para *bataviae* ao título de 1/200. Sendo ambos homens de campo, em contato permanente com animais, provàvelmente tiveram contato com tais sorotipos de leptospira através dêles. Os demais sorotipos foram encontrados em trabalhadores de culturas diversas, principalmente canaviais. Os canaviais são "habitat" muito procurado por animais silvestres, principalmente roedores. Fácil é, portanto, que os cortadores de cana se contaminem durante o trabalho, indiretamente através dos roedores que funcionam como reservatório de leptospiras e que as eliminam nos canaviais através da urina.


## SUMMARY

*A survey for leptospiral antibodies among workers of several occupations*

A serological investigation for the presence of leptospiral antibodies was carried out in 1766 human serum samples, from various occupations, in the State of São Paulo (Brazil) as follows: 317 garbage collectors in the city of São Paulo, 172 sewer workers in the same city and 1277 field laborers (dairy workers, hog workers, sugar cane cutters, etc.). Most of the people were engaged in work that had to be performed on or in water. The test used in this survey was the microscopic agglutination, in tubes, using 22 leptospiral serotypes as live antigens. Details of the results are shown in Table II.

From field workers, 69 samples (5.4%) out of 1277 were positive most frequently for strains of serogroups *canicola, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, pomona* and *bataviae*. Only one sera reacted to the serogroup *hebdomadis* (serotype *sejroe*) with a titer of 1/1600, the highest found in the test. From garbage collectors 31 samples (9.7%) out of 317 were positive. The reactions were predominantely positive for strains of serogroups *icterohaemorrhagiae, canicola, grippotyphosa* and *andamana*.

In a total of 172 sera examined from sewer workers, only one sera (0.5%) reacted positively.



## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos os funcionários do serviço de limpeza urbana da Prefeitura da Cidade de São Paulo, bem como àqueles do Departamento de Águas e Esgotos, que facilitaram a coleta de material para a realização dêste trabalho.


## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. ALSTON, J. M. & BROWN, H. C. — The prevalence of Weil's disease in Certain Occupations. *Brit. Med. J.*, **2**:339-340, 1935.

2. CASTRO, A. F. P. de; SANTA ROSA, C. A.; ALMEIDA, W. F. & TROISE, C. — Pesquisa de aglutininas anti-leptospira entre magarefes em alguns municípios do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **8**:287-290, 1966.

3. CORRÊA, M. O. A.; AMATO NETO, V.; VERONESI, R. & BRANDÃO, C. H. — Inquérito sorológico para o Diagnóstico de Leptospiroses entre lavradores de arrozais do Vale do Rio Paraíba. *Rev. Inst. Adolpho Lutz*, **14**:33-38, 1954.

4. CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; OLIVEIRA, L.; MARTINS, J. E. C. & AMATO NETO, V. — Inquérito sorológico para leptospirose entre trabalhadores da limpeza pública da cidade de São Paulo. *Rev. Paul. Med.*, **70**:102, 1967.

5. CORRÊA, M. O. A.; HYAKUTAKE, S.; NATALE, V.; TIRIBA, A. C. & GALVÃO, P. A. A. — Leptospiroses humanas ainda não assinaladas no Brasil. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo*, **6**:71-74, 1964.

6. FUCHS, G. H. P. — Zur Problematik arbeitsbedingter Leptospiren Infektionem bei Angehorigen seg. Schmutzberunge. *Zentr. Bl. Bakt.* (orig.), **180**:549-561, 1960. Resumo in *Bull. Hyg.* (London), **36**:470, 1961.

7. GALTON, M. M.; MENGES, R. W.; SHOTS, E. B.; NAHAMIAS, A. J. & HEAT, C. W. — Leptospirosis; epidemiology, clinical manifestations in man and animals, and methods in laboratory diagnosis. *Public Health Serv. Publ.*, n.º 951. United States Government Printing Office. Washington, 1962.

8. GOMES, M. C. O.; HYAKUTAKE, S. & CORRÊA, M. O. A. — Investigação sôbre a ocorrência de Leptospiroses em trabalhadores de diversas profissões no distrito séde do município de Sorocaba. *Rev. Inst. Adolpho Lutz* (São Paulo), **28**:12-26, 1968.

9. HYAKUTAKE, S.; CORRÊA, M. O. A.; NATALE, V.; COUTO, M. C.; MAZZARI, R. & PACHECO, A. — Inquérito sorológico para o diagnóstico de leptospiroses entre cortadores de cana de açúcar de alguns municípios do Estado de São Paulo. *Rev. Inst. Adolpho Lutz* (São Paulo), **25/27**:11-114, 1965/1967.

10. JUNGK, C. — Leptospireninfektionem bei Kanalarbeitern. *Arch. Gewerbepath.*, **15**:565-571, 1957.

11. LAROCH, V. — La leptospirose humaine in Haiti. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, **59**:414-422, 1965.

12. MAGALDI, C. — *Contribuição à epidemiologia das leptospiroses. Investigação em trabalhadores na rêde de esgotos da cidade de São Paulo.* Tese. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1962.

13. MEIRA, D. A. & SANTA ROSA, C. A. — Estudo epidemiológico e clínico da leptospirose em detentos de São Paulo. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo,* **19**: 163-172, 1964.

14. MILLER, N. G. — A serologic investigation of leptospiral infections in dairy farmers and cattle ranchers. *Amer. J. Hyg.*, **74**:203-208, 1961.

15. SMITH, J. & DAVIDSON, L. S. P. — The incidence of weil's disease in fish workers in aberdeen. *J. Hyg.* (London), **36**:438-445, 1936.

16. STILES, W. W. & SAWYER, W. A. — Leptospiral infection (Weil's Disease) as an occupational Hazard. *J.A.M.A.*, **118**:34-38, 1942.

17. STUART, R. D. — The occurrence of Weil's Disease Among Miners in the West of Scotland. *J. Hyg.* (London), **39**:316-323, 1939.

18. STUART, R. D. — Weil's Disease in Glasgow sewer workers. *Brit. Med. J.*, **1**:324-326, 1939.

19. TAYLOR, J. & GOYLE, A. N. — Leptospirosis in the Andamans with an Appendix on the Present Knowledge of Leptospiral Infections Indian M. Research (Memoir n.º 20) March 1931, p. 1. Abwth. *Trop. Dis. Bull.*, **28**:793, 1931.

---

Recebido para publicação em 14/4/1970.

*Rev. Microbiol.*
*1(1):25-32, julho-setembro, 1970*

# INFLUENCE OF STREPTOMYCIN ON THE PRODUCTION OF PYOCYANIN BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Flavio ALTERTHUM (1)

## SUMMARY

The production of pyocyanin by *Pseudomonas aeruginosa* can be influenced by a great many factors including some antibiotics. The literature on this last aspect is controversial particularly as regards the action of streptomycin. In this paper it was shown that the addition of varying concentrations of streptomycin to cultures of *Pseudomonas aeruginosa* in Sabouraud-maltose plus 2 per cent glycerin results in an increase in the production of pyocyanin up to 300 $\mu$g of streptomycin; higher amounts of the antibiotics produce no further increase in chromogenesis. It was verified that the increase is due to the selection of microorganisms more capable of producing pyocyanin. These two properties, chromogenic ability and resistance to streptomycin are therefore linked.

## INTRODUCTION

One of the more interesting aspects of the biology of *Pseudomonas aeruginosa* is its capacity to produce pyocyanin, a pigment with an unique array of poperties but whose role in the physiology of that microorganism remains unknown.

Many factors are able to influence, in different ways, the biosynthesis of pyocyanin. By varying the composition of the culture medium, for instance, one may considerably enhance the production of the pigment or, on the contrary, decrease it or even suppress it completely. On the other hand it is quite obvious that different strains of *Pseudomonas aeruginosa* may also differ in their pyocyanin producing capacity and no amount of juggling with the composition of the culture medium will increase, beyond a certain point, the amount of pigment synthesized by a poor producer.

The influence of antibiotics on the production of pyocyanin has also been studied, sometimes with conflicting results.

The first studies on the subject are due to SELIGMANN & WASSERMANN [19] who observed that strains of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to streptomycin (up to 50,000 mg/l) produced pigment when grown on nutrient agar, whereas sensitive strains (64 mg/l) were quite non-chromogenic; they also observed that the resistant strains did not grow as well as the sensitive ones in this medium. They concluded that the action of the antibiotics was due to a change in the metabolic activity of the microorganisms rather than to a selection of mutant strains, since when grown in the absence of the drug for six months they resumed their original capacity to produce pyocyanin.

GAINOR & WILLIAMSON [8] obtained "flocculent" variants of a strain of *Pseudomonas aeruginosa;* they showed that the smooth parent strain was a better producer of pigment and was streptomycin-resistant, whereas the "flocculent" variants were streptomycin-sensitive and unable to produce the pigment. A correlation between resistance to streptomy-

This paper is partially based on the Author's doctorate thesis. Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, Brasil

(1) Present address: Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo, Caixa Postal 30.786, São Paulo, Brasil

cin and pigment production was also noted by ANDRIEU et al. [1, 2]. On the other hand FUJITA [7], studying the effect of several antibiotics on *Pseudomonas aeruginosa*, observed no interference with pigment production, with one exception: it was significantly inhibited by chloramphenicol. This action of chloramphenicol was confirmed by SCHNEIERSON et al. [18]; they also showed that erithromycin had the same effect whereas streptomycin in the concentration of 100 mg/l had none.

HALPERN et al. [13], working with resting cell suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* observed that chloramphenicol inhibited the synthesis of pyocyanin if added during the lag phase of production. This phase, that lasts around 6 hours (either for resting cell suspensions or for growing cultures (FRANK & DE MOSS [6], GROSSOWICZ et al. [12], is explained by HALPERN et al. [13] as the time needed for the synthesis of a precursor. For this reason the addition of the drug after 6 hours had no effect.

Finally, PARK et al. [17] observed that streptomycin and kanamycin stimulated pyocyanin production whereas neomycin and erythromycin inhibited it.

In this paper we have tried to establish the true effect of streptomycin on pyocyanin production. For this a quantitative study was considered necessary. To avoid a possible source of error due to the composition of the culture medium we have used that which in our experience has given a maximum yield of pyocyanin and pratically no pyoverdin: Sabouraud maltose with the addition of 2% glycerol. MARTINEAU & FORGET [16] and DAVIS et al. [5] showed that in Sabouraud maltose pyocyanin was produced earlier and more abundantly than in other media. On the other hand it has been known for some time that glycerol increases the production of pyocyanin [9, 10]. It has also been shown (BLACKWOOD & NEISH [3]; INGRAM & BLACKWOOD [14]; CHANG & BLACKWOOD [4]) that glycerol furnishes C atoms for the biosynthesis of pyocyanin. We used a liquid medium to facilitate the dosage of the pigment.

## MATERIALS AND METHODS

*Organism* — In this work we used a strain of *Pseudomonas aeruginosa* from our collection, originally isolated from a fatal case of meningitis.

*Obtention of sensitive and resistant strains* — From the original strain of *Pseudomonas aeruginosa*, sensitive (125 mg/l) and resistant (> 100,000 mg/l) strains were obtained by the classical replica plating technique of LEDERBERG & LEDERBERG [15].

*Antibiotic solution* — The solution of streptomycin sulphate (obtained from Fontoura Wyeth S. A.) were prepared by dissolving the required amount of the salt in the culture medium.

*Culture medium* — The composition of the culture medium was the following: Bacto Peptone (Difco), 10 g; maltose (Merck), 40 g; glycerol (Merck), 20 ml; distilled water q.s.p. one liter. Whenever a solid medium was used 15 g of agar (Difco) were added. The final pH was 7.2.

*Standard cell suspension* — The sediment from a 24 hour culture of *Pseudomonas aeruginosa* in the above medium was washed with saline and the turbidity brought to 8.° (approximately $6.3 \times 10^8$ cells/ml) in a Coleman Photonephelometer. One ml of this suspension added to 99 ml of culture medium was the standard cell suspension.

*Incubation* — In all experiments 25 × 250 mm tubes containing a final volume of 10 ml, were placed in a reciprocating shaker (100 shakes/min), in an inclined position (30°) and incubated at 37°C.

*Pyocyanin determination* — The method of FRANK & DE MOSS [6] was used with a few modifications: a) 2 ml of the culture and 2 ml of 20 per cent trichloracetic acid were mixed in a centrifuge tube; b) the mixture was boiled for 10 minutes, cooled and centrifuged; c) 2 ml of the supernatant were placed in the spectrophotometer cuvette; 2 ml of a 2M Tris solution were added to develop the colour fully; d) the optical density was read in a Coleman Jr. II Spectrophotometer at 690 m$\mu$; e) the values were calculated from a standard curve. In the preparation of this curve the pyocyanin was added to cultures of *Pseudomonas aeruginosa* grown in such a way that no pigment was produced.

## RESULTS

*Influence of streptomycin in the final yields of pyocyanin* — The final yields of pyocyanin from cultures grown in the presence of 100, 200, 300, 400 and 500 mg/l of streptomycin were compared with the yield in the

absence of the antibiotic. For each concentration, 14 tubes were prepared and for each determination 2 were used. The results are presented in Table I, and plotted in Fig. 1. They show quite plainly that the addition of increasing amounts of streptomycin leads to an increase in the final yield of pyocyanin albeit retarding the moment where maximum production is reached. It is also apparent that amounts of antibiotic above 300-400 mg/l do not significantly promote a further increase in pyocianin production.

*Influence of streptomycin on the growth curve of Pseudomonas aeruginosa* — The normal growth curve was compared with the curve obtained in the presence of 300 mg/l of streptomycin. Viable counts were performed at suitable intervals and the results are plotted in Fig. 2. During the first 5 hours that amount of streptomycin induces a significant reduction in the number of viable organisms. Henceforth, growth is resumed until it reaches a level similar to that of the normal curve, although much later.

TABLE I

Influence of streptomycin on the final yields of pyocyanin

| Streptomycin added (mg/l) | Amounts of pyocyanin produced (mg/l) | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 24 hs | 36 hs | 48 hs | 60 hs | 72 hs | 84 hs | 96 hs |
| Blank | 8 | 15 | 22 | 24 | 29 | 31 | 33 |
| 100 | 50 | 124 | 129 | 126 | 134 | 135 | 128 |
| 200 | 52 | 134 | 184 | 198 | 213 | 204 | 191 |
| 300 | 7 | 108 | 235 | 250 | 270 | 263 | 260 |
| 400 | 1 | 79 | 217 | 271 | 282 | 257 | 279 |
| 500 | — | 45 | 192 | 270 | 268 | 272 | 279 |

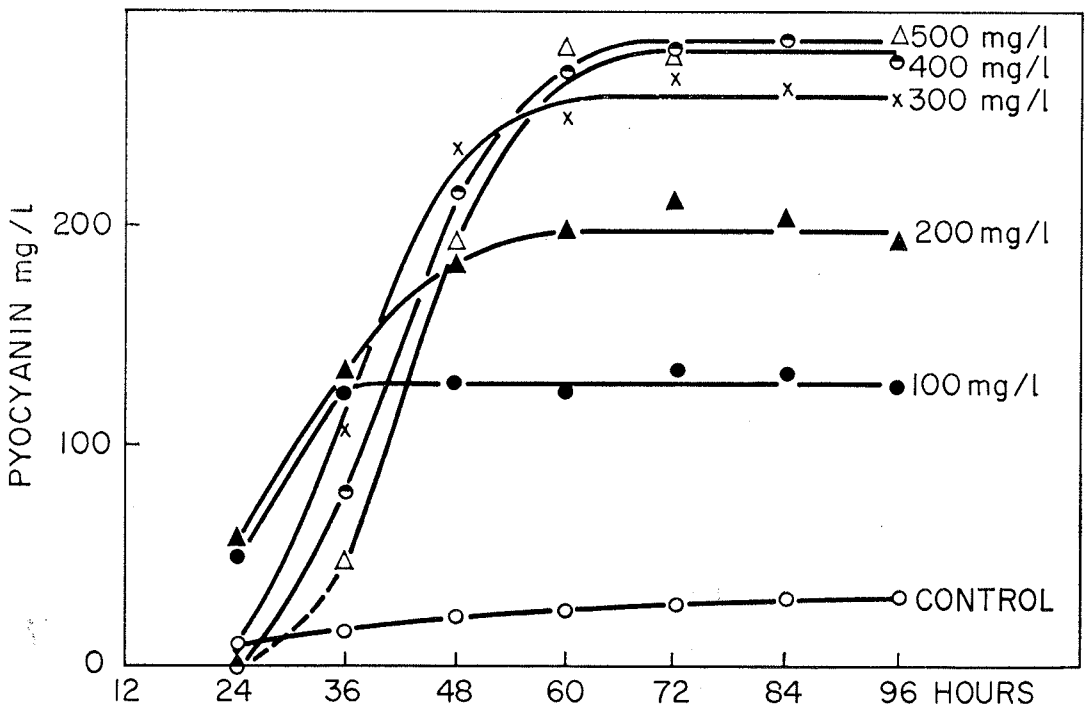



Fig. 1 — Influence of streptomycin in the final yields of pyocyanin

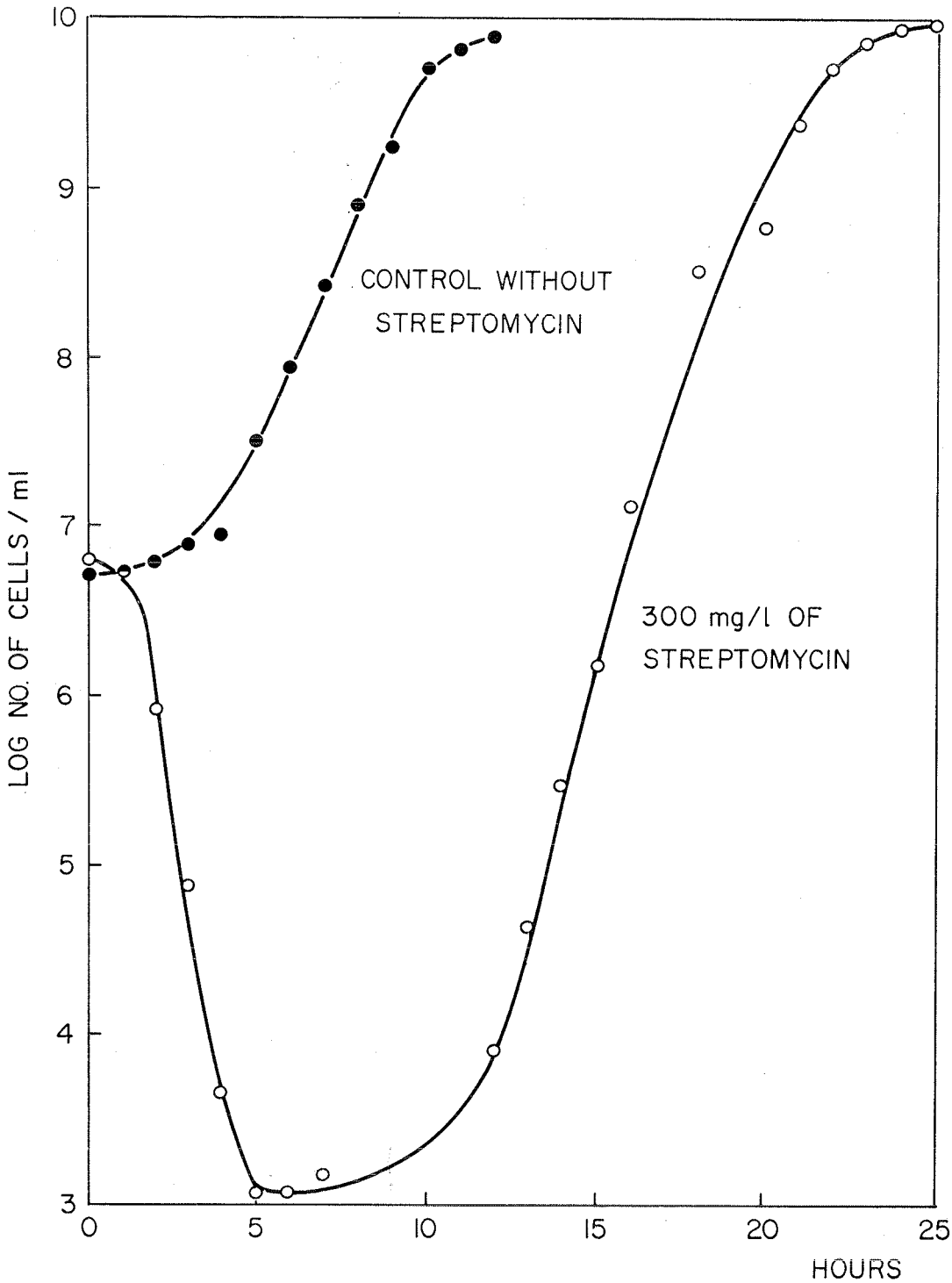



Fig. 2 — Influence of streptomycin on the growth curve of *Pseudomonas aeruginosa*

*Influence of different amounts of streptomycin on the first 5 hours of growth* — Starting from a suspension containing $5.9 \times 10^6$ cells/ml, several survival curves were prepared with amounts of streptomycin varying from 50 to 800 mg/l. The results are presented in Fig. 3. Again it is shown that amounts of streptomycin above 400 mg/l do not significantly produce further reductions in the number of viable organisms,

*Production of pyocyanin by sensitive and resistant strains of Pseudomonas aeruginosa* — The results of this experiment are presented in Table II and show very clearly that sensitive strains are poor pyocyanin producers whereas the resistant ones are good producers; in this latter case the final yields are identical whether the medium contains streptomycin or not.

of streptomycin and approximately after 60-72 hours with 300 mg/l or more. In a study of the influence of antibiotics on the production of pyocyanin this must be taken in consideration and the results cannot be read after an arbitrarily established number of hours (24 hours in most cases). This may explain some of the conflicting results found in the literature.

TABLE II

Production of pyocyanin by sensitive and resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*

| Strains of *Pseudomonas aeruginosa* | Pyocyanin produced after 60 hours (mg/l) | |
|---|---|---|
| | Medium without streptomycin | Medium containing 300 mg/l of streptomycin |
| Original | 24 | 240 |
| Sensitive | 4 | no growth |
| Resistant | 250 | 260 |

## DISCUSSION

From the results presented in Table I and plotted in Fig. 1, it is evident that the addition of streptomycin to cultures of *Pseudomonas aeruginosa* brings about an increase in the production of pyocyanin. This effect bears a relationship to the amount of antibiotic used, up to 300 μg/ml. With larger doses there is no further significant increase. These results are in disagreement with those of SCHNEIERSON et al. [18] but confirm those of PARK et al. [17]. Another fact emerges from the analysis of the production curves: as the amount of streptomycin increases, the maximum yields are obtained progressively later. It has been shown (GROSSER & FRIEDRICH [11]; GROSSOWICZ et al.[12], and FRANK & DE MOSS[6]) that the production of pyocyanin begins after a 6-8 hour lag which corresponds to the exponential growth phase of the organism. Measurable amounts of pyocyanin begin to appear at the end of this phase. In our experiments pyocyanin began to appear in the medium without streptomycin after 12 hours. The addition of the antibiotic caused a delay in the production of the pigment which may be explained by the initial killing of part of the microbial population thus retarding the onset of growth (Fig. 2) and, therefore, the production of pyocyanin. Maximum yields are reached after 36 hours with 100 mg/l

One explanation of these results is suggested by the work of ANDRIEU et al. [2] and of SELIGMANN & WASSERMANN [19], who postulate a direct interference of streptomycin upon the metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa*. The latter Authors, as a matter of fact, insist that "it seems to be beyond doubt that experimentally induced streptomycin resistance is correlated with regular changes in metabolic activities. The possibility of biological selection plays a minor part, if any, in these experiments".

This hypothesis seemed to us quite untenable. It seemed more logical to admit that the pigment producing capacity is genetically controlled and is in some way linked to an increased resistance to streptomycin. The action of the antibiotic, therefore, would be selective, destroying the sensitive organisms, which are also less capable of producing pyocyanin. If this is true, one must of necessity have three consequences:

1) it is possible to obtain spontaneous mutant which are simultaneously resistant to streptomycin and better pyocyanin producers;

2) these two characteristics are genetically linked;

3) these streptomycin-resistant organisms will produce greater amounts of pyocyanin even in the absence of the antibiotic.

Using Lederberg's replica plating technique we isolated, from the original strain, sensitive and highly resistant strains. The resistant strain produced equal amounts of pyocyanin whether in the presence or in the absence of streptomycin whereas the sensitive strain was unable to grow in the presence of 300 mg/l of streptomycin and produced practically no pyocyanin in medium devoid of streptomycin. These results are presented in Table II.

The results plotted in Fig. 2, furnish additional evidence for this hypothesis, since they show quite clearly that in the presence of 300 mg/l of streptomycin the greater part of the microbial population is destroyed; the remaining organisms are obviously the resistant mutants. They also explain the delay in reaching the maximum yield when the microorganism is grown in the presence of streptomycin.

The results presented in Fig. 3, show quite clearly the effect of the antibiotic dose on the size of the viable population within the first 5 hours. The reduction closely parallels the dosage of streptomycin until 300-400 mg/l are used. From then on the effect is not significant. This is also in agreement with the hypothesis presented. In other words, the maximum yield of pyocyanin of a given

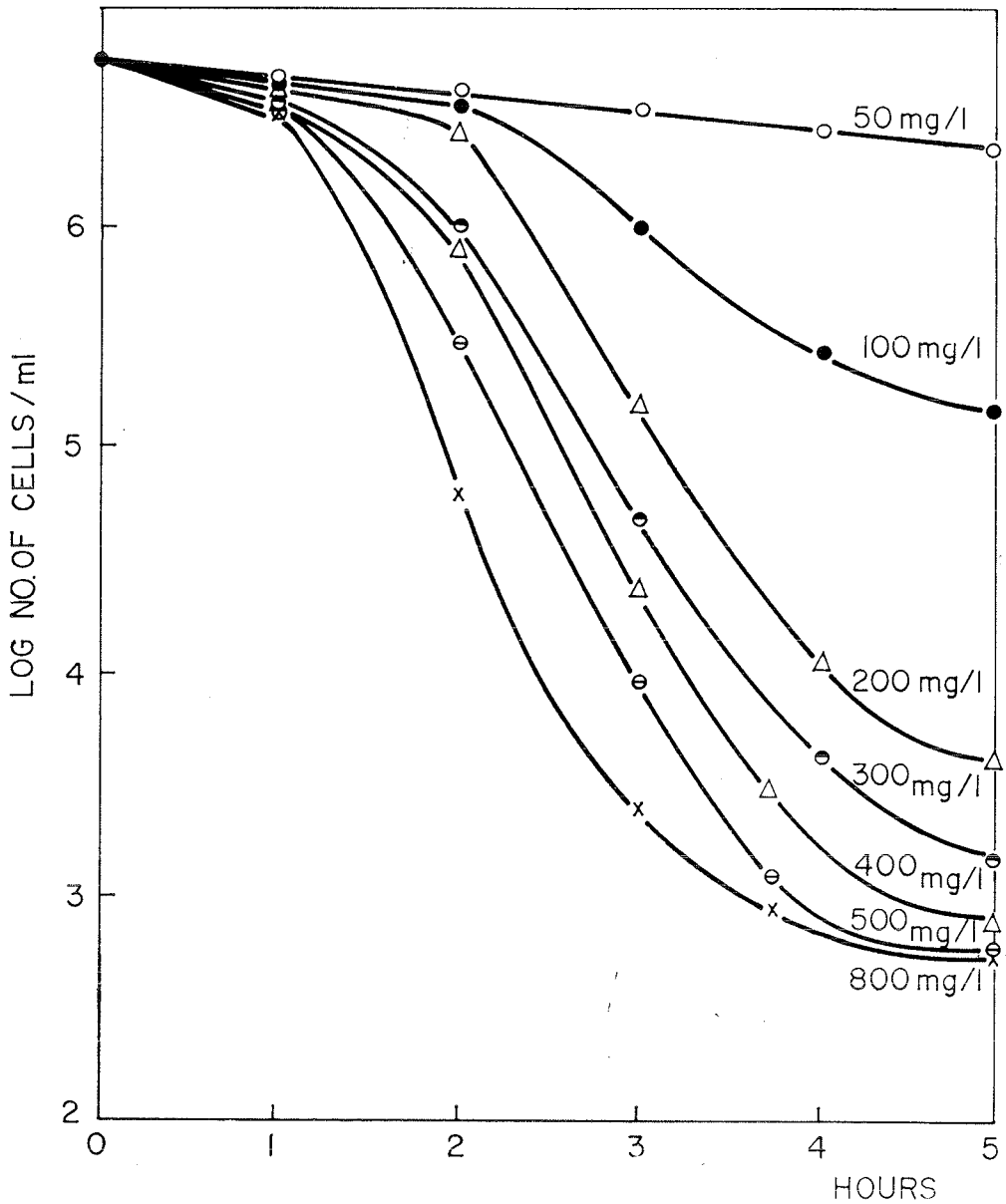



Fig. 3 — Influence of different amounts of streptomycin on the first 5 hours of growth

strain is related to the number of streptomycin-resistant organisms present in the population. A dose of 300-400 mg/l of streptomycin destroys all or practically all of the sensitive organisms and therefore the amount of pyocyanin produced is maximal. When lesser amounts of antibiotic are used the amounts of pyocyanin produced are roughly proportional to them (in reality to the proportion of resistant organisms remaining after destruction of a part of the sensitive population). It is not surprising, therefore, that the amounts of added streptomycin, plotted against the amounts of pyocyanin produced, should give a type of saturation curve and a plot of the reciprocals of those amounts, a straight line (Fig. 4).

## CONCLUSIONS

1) The addition of streptomycin to cultures of *Pseudomonas aeruginosa* enhances the production of pyocyanin.

2) The amounts of pyocyanin produced under such conditions are proportional to the amounts of streptomycin added up to 300-400 mg/l of the antibiotic, for a population of $6 \times 10^6$ cells/ml. Further increases in the dose of streptomycin do not significantly influence the process.

3) The increase in pyocyanin production is due to the selection of streptomycin

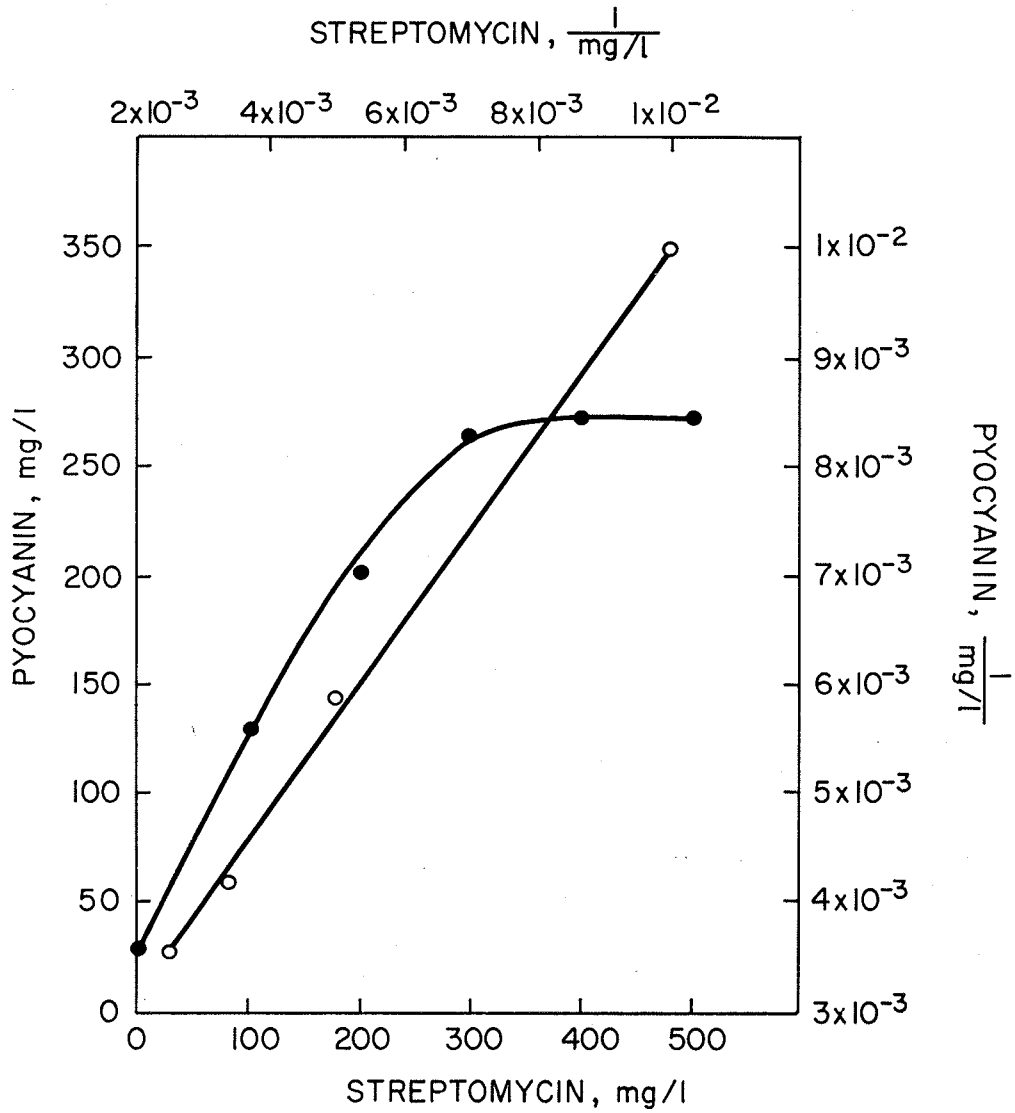



Fig. 4 — Relationship between the yield of pyocyanin and the amount of streptomycin added
o-o — hower abcissa and left ordinate
x-x — depper abcissa and righ ordinate

resistant mutants which are also more capable of producing the pigment. These two properties, therefore seem to be genetically linked.


## RESUMO

*Influência da estreptomicina na produção de piocianina por* Pseudomonas aeruginosa

A produção de piocianina por *Pseudomonas aeruginosa* pode ser influenciada por inúmeros fatôres, inclusive alguns antibióticos. Com relação a êstes, a literatura é controvertida no que se refere à ação da estreptomicina.

Nêste trabalho demonstramos que a adição de quantidades variáveis de estreptomicina a culturas de *Pseudomonas aeruginosa* em Sabouraud-maltose com 2% de glicerina, resultou num aumento na produção de piocianina. O máximo era atingido quando adicionávamos 300 mg de estreptomicina por litro; quantidades maiores de antibióticos não aumentavam a cromogênese. Verificou-se que o aumento era devido à seleção de microrganismos mais capazes de produzir piocianina. Estas duas propriedades, capacidade cromogênica e resistência à estreptomicina, estão, portanto, associadas.


## REFERENCES


1. ANDRIEU, G.; MONNIER, J. & BOURSE, R. — La sensibilité du bacille pyocyanique aux agents antibacteriens d'utilisation clinique. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), **92**:176-189, 1957.

2. ANDRIEU, G.; MONNIER, J. & BOURSE, R. — La sensibilité du bacille pyocyanique aux agents antibacteriens d'utilisation clinique. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), **92**:322-334, 1957.

3. BLACKWOOD, A. C. & NEISH, A. C. — Pyocyanine formation from labelled substrates by *Pseudomonas aeruginosa. Canad. J. Microbiol.*, **3**:165-169, 1957.

4. CHANG, P. C. & BLACKWOOD, A. C. — Simultaneous bio-synthesis of pyocyanine, phenazine-1-carboxilic acid, and oxychloroaphine from labelled substrates by *Pseudomonas aeruginosa* Mac 436. *Canad. J. Biochem.*, **46**:925-929, 1968.

5. DAVIS, I.; SELLERS, W.; ORBACH, H. & WEDDINGTON, G. — An evaluation of several media for the early detection of *Pseudomonas aeruginosa* encountered in clinical practice. *J. Lab. Clin. Med.*, **55**:139-143, 1960.

6. FRANK, L. H. & De MOSS, R. D. — On the biosynthesis of pyocyanine. *J. Bact.*, **77**:776-782, 1959.

7. FUJITA, H. — Influence of antibiotics on the production of pyocyanin and fluorescin by *Pseudomonas aeruginosa* and the occurrence of nonpyocynin strains from clinical specimens. *Mie Med. J.*, **7**:169-174, 1957.

8. GAINOR, C. & WILLIAMSON, C. K. — Some resistence studies on a smooth phase and a floculent variant of *Pseudomonas aeruginosa. J. Amer. Pharm. Ass.* (Sci. ed.) **40**:446-448, 1951.

9. GESSARD, M. C. — Nouvelle recherches sur le microbe pyocyaniqué. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), **4**:88-102, 1890.

10. GESSARD, M. C. — Diagnose pigmentaire du bacille pyocyaniqué. *Ann. Inst. Pasteur* (Paris), **33**:241-260, 1919.

11. GROSSER, A. M. & FRIEDRICH, W. — Zur Mikrobiologisch-chemischen Gewinnung von Pyocyanin in der Submerskultur. *Z. Naturf.* 3b, **11/12**:425-430, 1948.

12. GROSSOWICZ, N.; HAYAT, P. & HALPERN, Y. S. — Pyocyanine biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa. J. Gen. Microbiol.*, **16**:576-583, 1957.

13. HALPERN, Y. S.; TENEH, M. & GROSSOWICZ, N. — Further evidence for the production of pyocyanine by non proliferating suspensions of *Pseudomonas aeruginosa. J. Bact.*, **83**:935-936, 1962.

14. INGRAM, J. M. & BLACKWOOD, A. C. — Studies on the biosynthesis of pyocyanine. *Canad. J. Microbiol.*, **8**:49-56, 1962.

15. LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E. M. — Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bact.*, **63**:399-406, 1952.

16. MARTINEAU, B. & FORGET, A. — Routine use of Sabouraud maltose agar for rapid detection of the bluish-green pigment of *Pseudomonas aeruginosa. J. Bact.*, **76**:118-119, 1958.

17. PARK, S. W.; CHI, J. M. & CHANG, W. Y. — The effects of antibiotics and enzyme inhibitors on pyocyanine and cytochrome oxidase formation by *Pseudomonas aeruginosa. Korean Choong Ang. Med. J.*, **41**: 143-147, 1964. Apud *Chem. Abstr.*, **61**:60-77, 1964.

18. SCHNEIERSON, S. S.; AMSTERDAN, D. & PERLMAN, B. — Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* pigment formation by Chloramphenicol and Erythromycin. *Antibiotics Chemother.*, **10**:30-33, 1960.

19. SELIGMANN, E. & WASSERMANN, M. — Induced resistance to streptomycin. *J. Immun.*, **57**:351-360, 1947.


Recebido para publicação em 14/4/1970.

*Rev. Microbiol.*
*1(1):33-42, julho-setembro, 1970*

# PESQUISA DE AFLATOXINA B-1 E SUBSTÂNCIAS FLUORESCENTES SIMILARES EM FARINHA DE TRIGO

Adhemar PURCHIO (1)

## RESUMO

Com o objetivo de obter uma técnica rápida conservando, porém, boa sensibilidade para extração e detecção das aflatoxinas, sugerimos uma modificação do método de PONS Jr. & col. [10], adotando a purificação dos extratos com éter etílico na placa de cromatografia, conforme preconizaram NABNEY & NESBITT [9]. Através desta técnica simplificada e utilizando a espectrofotometria na região ultra-violeta e cromatografia em camada delgada em outros dois sistemas de solventes para comprovação da existência de aflatoxina, analisamos 20 amostras de farinha de trigo. Paralelamente, foi estudada a presença de *Aspergillus* sp nesse material e a produção de aflatoxina B-1 pelos mesmos. Foi detectada aflatoxina B-1 em duas amostras de farinha de trigo (FT-3 e FT-XV) nas concentrações de 1,84 e 0,36 mg/100 g. Os *Aspergillus* sp foram, tão sòmente, classificados em gênero e não houve correlação entre a presença de aflatoxina B-1 e a existência dêstes fungos capazes de metabolizá-las, nos alimentos. Foram estudados ainda diversos aspectos da existência de manchas fluorescentes similares às aflatoxinas, verificando-se a presença das mesmas em quase tôdas as amostras analisadas. Por êste motivo, duas culturas de *Aspergillus* sp (FT-X e FT-XVI) foram consideradas suspeitas, pois os métodos empregados para a diferenciação entre as reais e não verdadeiras, não foram suficientes para fornecer resultados definitivos. A evidenciação da aflatoxina B-1 em duas amostras de farinha de trigo aumenta a possibilidade de implicação desta micotoxina em patologia humana. Êste alimento consumido, quase que diàriamente, pela população pode veicular a substância tóxica, não se apresentando aparentemente contaminado por amostras toxigênicas de *Aspergillus*. Contrôles rigorosos devem ser feitos pelos organismos estatais e particulares no sentido de rejeitar alimentos contendo esta micotoxina, cujos efeitos no organismo devem ser melhor investigados.

## INTRODUÇÃO

Pesquisadores de diversas instituições têm conjecturado, nos últimos tempos, a respeito de uma possível implicação da aflatoxina, metabólito tóxico produzido pelo *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*, em diversas manifestações patológicas no organismo humano. Casos freqüentes de hepatomas e cirrose hepática, em grupos populacionais expostos a alimentação passível de emboloramento, têm sido apontados como tendo etiologia relacionada àquela micotoxina.

Diversos produtos agrícolas foram descritos como portadores de aflatoxina como, por exemplo, nas epidemias ocorridas na Inglaterra, onde se levantou, inicialmente, o problema. O alimento implicado era o amendoim sob a forma de tortas e rações para aves e gado.

Para o homem, no entanto, o aspecto principal estaria relacionado à presença ou não das aflatoxinas no óleo de amendoim e em outros produtos comestíveis. Verificou-se,

(1) Professor Assistente-doutor de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.S.P. Prof. Assistente da Faculdade de Medicina de Jundiaí (Dept.º de Microbiologia e Imunologia), São Paulo, Brasil

inicialmente, que a toxina é solúvel em óleo [3] mas não naqueles solventes normalmente empregados na sua extração. Durante o processo de refinação por meio de álcalis, as aflatoxinas sofreriam processo de degradação [11]. Como assinala MORAIS [8] o óleo extraído por prensagem e não refinado poderia conter a toxina, pois todos os farelos de amendoim por êle analisados continham a substância tóxica.

ALLCROFT & CARNAGHAN [1] relataram o aparecimento de substância tóxica no leite de vacas alimentadas com ração concentrada, contendo 20% de farelo tóxico. Além disso, verificaram que a pasteurização não reduzia, de maneira significativa, o teor da substância tóxica.

HESSELTINE & col. [7] salientam que o *A. oryzae* e seus parentes próximos são muito utilizados na preparação de alimentos fermentados. Em vista da estreita correlação entre o *A. flavus* e o *A. oryzae*, necessário se torna, no dizer dos Autores, estudar a formação de aflatoxina em produtos alimentícios elaborados com estas espécies de fungos. Produtos agrícolas como soja, amendoim, milho, trigo e arroz, não apenas permitem o crescimento do *A. flavus* como possibilitam a produção de grandes quantidades de aflatoxina.

Examinando amostras de fungos utilizados na produção de alimentos fermentados, foram encontradas diversas "cepas" produzindo substâncias semelhantes à aflatoxina B-1. Estas apresentavam fluorescência e $R_f$ idênticos às verdadeiras e sòmente pelo exame químico estrutural e testes biológicos é que se poderia fazer a diferenciação entre elas [12].

Pela demonstração da existência da aflatoxina em alimento de consumo generalizado, estaríamos contribuindo com mais um elemento para a elucidação do intrincado problema da atividade patogênica desta substância no organismo humano. Nosso trabalho dá ênfase especial à aflatoxina B-1 por ser a mais tóxica e melhor estudada e também por sabermos que a produção da B-2 e da G-2 é de aproximadamente 1/40 e 1/50 em relação à B-1 e G-1, respectivamente [6]. Além do mais fizemos questão de realizar a pesquisa trabalhando sòmente com alimentos que não se apresentavam embolorados e que poderiam conter a substância tóxica, além de esporos dos *Aspergillus* responsáveis por sua elaboração.

Ao mesmo tempo fizemos um estudo da incidência de amostras de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas, nos alimentos analizados e provenientes de diversas localidades do Estado de São Paulo. Não nos preocupamos com fungos do gênero *Penicillium*, pois sua capacidade de produção de aflatoxinas é muito discutível [5].

## MATERIAL E MÉTODOS

Realizamos êste trabalho utilizando 20 amostras de farinha de trigo coletadas no comércio da Capital de São Paulo. A proveniência numérica corresponde à cidade onde se localiza o moinho de beneficiamento dêste produto. As amostras colhidas apresentavam acondicionamento em sacos de papel com capacidade de um quilograma.

### *Extração e detecção das aflatoxinas*

Pela rapidez de execução e sensibilidade apresentada, seguimos a técnica extrativa preconizada por PONS Jr. & col. [10]. Trata-se, em resumo, de desengordurar o material em estudo pela acetona a 70%, precipitar certas substâncias interferentes como pigmentos, pelo acetado de chumbo neutro e extrair o princípio tóxico pelo clorofórmio. O extrato resultante é submetido à cromatografia em camada delgada de sílica-gel (Kieselgel-G), com espessura de 500 m$\mu$, em placas de vidro de 20 × 20 cm. Realizamos as extrações partindo de amostras de 50 g de material e trabalhamos com alíquotas de 0,1 ml dos extratos clorofórmicos e 0,05 ml do padrão. O desenvolvimento dos cromatogramas foi realizado em cubas de vidro apropriadas e não equilibradas, pois tem-se notado que há melhor resolução das aflatoxinas nestas condições. Como os extratos apresentassem ainda alto teor de impurezas que prejudicam a visualização dos cromatogramas sob luz ultravioleta de onda larga, resolvemos adotar o processo de purificação na própria placa, segundo o método de NABNEY & NESBITT [9]. Êstes Autores idealizaram a purificação de extrato realizando um primeiro desenvolvimento com éter etílico que, como se sabe, desloca muito pouco as aflatoxinas do ponto de partida, deslocando, ao mesmo tempo, certas manchas fluorescentes interferentes. Promove-se a seguir um segundo e um terceiro desenvolvimento, utilizando o sistema clássico clorofórmio-metanol (97:3).

Nêste trabalho, promovemos a comparação de dois métodos cromatográficos para comprovar a eficiência do éter etílico na purificação dos extratos, avaliando até que ponto

sua intervenção é eficaz. No método cromatográfico-1 trabalhamos apenas com o sistema clorofórmio-metanol (97:3) e no método cromatográfico-2, primeiramente com o éter etílico e depois com o clorofórmio-metanol. Promovemos, também, a leitura espectrofotométrica das soluções metanólicas das manchas fluorescentes suspeitas. Para a comprovação dos resultados obtidos, realizamos desenvolvimento dos extratos positivos, suspeitos, de um negativo e do padrão em mais dois sistemas de solventes ou sejam clorofórmio-acetato de etila (3:1) e acetato de etila-metanol (3:1) [12].

Assim, o primeiro dêstes sistemas constitui o método cromatográfico-3 seguido do método cromatográfico-4 no qual foi introduzida, simplesmente, a purificação prévia pelo éter etílico. O segundo sistema constitui o método cromatográfico-5 e o de número 6 é representado pelo mesmo sistema purificado prèviamente pelo éter etílico.

Para o cálculo da concentração de aflatoxina B-1, nas amostras positivas utilizamos a fórmula preconizada por NABNEY & NESBITT [9] adaptada as nossas condições de trabalho.

*Isolamento de colônias de* Aspergillus sp *das amostras estudadas*

Como o *A. flavus* e o *A. parasiticus* têm características próprias de crescimento e fàcilmente diferenciáveis de certos *Aspergillus* com colorações diversas, como o *A. niger*, por exemplo, procuramos realizar a pesquisa sòmente com aquêles fungos que apresentassem características morfológicas semelhantes aos de nosso interêsse. Transferimos, inicialmente, algumas pequenas porções do material recebido para um tubo contendo solução salina estéril. O material era suspenso e depois de decantado, foram colhidas duas ou três porções do sobrenadante com alça de platina estéril e distribuído, conforme técnica convencional em placas de Petri com ágar-Sabouraud, contendo cloranfenicol-base numa concentração de 3 mg/100 ml de meio de cultura. Realizamos a identificação genérica, após tempo conveniente de incubação em estufa a 28°C, e transferimos as amostras isoladas para tubos de ágar-Sabouraud, designando a cultura com a sigla do alimento do qual foi isolada, utilizando a notação com algarismo romano.

*Verificação da produção de aflatoxinas pelas culturas isoladas*

A colônia isolada de *Aspergillus* sp, foi transferida para frascos de Roux contendo meio à base de sacarose a 20% como recomendado por DAVIS & col. [2]. Após 10 a 14 dias de incubação a 28°C, em estufa, procedemos à extração do meio de cultura após filtração em gase. A extração foi realizada em funil-separador, com três porções de 25 ml de clorofórmio. Os extratos reunidos foram concentrados, em placa termo-elétrica, a um volume final de 10 ml, submetendo-os à análise pelos métodos de estudo descritos anteriormente, para as extrações de alimentos.

## RESULTADOS

No Quadro I apresentamos os resultados obtidos por intermédio da cromatografia dos extratos das amostras de farinha de trigo e as manchas fluorescentes consideradas positivas (+) ou suspeitas (±) de serem aflatoxina B-1 que foram, posteriormente, eluídas para análise espectrofotométrica.

Em seguida, descrevemos no Quadro II os fungos isolados das amostras de farinha de trigo e no Quadro III temos os resultados obtidos através da cromatografia dos extratos dos meios de cultura dos *Aspergillus* sp isolados dos alimentos, assim como se encontram assinalados (□) os $R_f$ das manchas fluorescentes eluídas. Utilizamos, para designação dos extratos e das amostras de fungos, algarismos romanos para facilitar sua identificação. No Quadro IV encontram-se os resultados obtidos pela cromatografia em que foram utilizados os métodos 3, 4, 5 e 6.

Na Tabela I anotamos as absorbâncias obtidas pela leitura espectrofotométrica dos eluatos das manchas fluorescentes dos alimentos e na Tabela II, aquelas dos padrões. No Quadro V temos uma súmula dos resultados obtidos pelos diferentes métodos empregados na detecção da aflatoxina B-1.

Finalmente, para complementação do trabalho, realizamos estudo espectrofotométrico do padrão quantitativo de aflatoxina B-1 puro e após eluição das manchas obtidas na cromatografia de soluções contendo diversas concentrações do mesmo (Tabelas III e IV).

É de se notar que a presença de aflatoxina B-1 nos Quadros I, III e IV baseia-se exclusivamente na tonalidade da fluorescência emitida e no $R_f$ da mancha comparado com o do padrão. Quando êstes eram iguais ou

QUADRO I

Resultados obtidos através da cromatografia dos extratos das amostras de farinha de trigo (FT)

| Extratos | Método cromatográfico 1 | | | | Método cromatográfico 2 | | | | Presença de aflat. B1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | |
| FT-1 | — | — | — | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-2 | — | — | — | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-3 | 1 | azul | 0,48 | 0,58<br>0,46 | 1 | azul | 0,63 | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-4 | — | — | — | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-5 | — | — | — | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-6 | 1 | azul | 0,73 | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-7 | — | — | — | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-8 | 1 | azul | 0,88 | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-9 | — | — | — | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-10 | — | — | — | 0,58<br>0,46 | — | — | — | 0,64<br>0,52 | — |
| FT-11 | — | — | — | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |

| Extratos | Método cromatográfico 1 | | | | Método cromatográfico 2 | | | | Presença de aflat. B1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | |
| FT-12 | 2 | azul<br>azul | 0,63<br>0,17 | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-13 | — | — | — | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-14 | 1 | azul | 0,92 | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-15 | 3 | verde<br>azul<br>verde | 0,60<br>0,16<br>0,12 | 0,59<br>0,48 | 2 | azul<br>verde | 0,64<br>0,51 | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-16 | 1 | verde | 0,63 | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-17 | 1 | azul | 0,70 | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-18 | 2 | azul<br>azul | 0,73<br>0,18 | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-19 | 1 | verde | 0,70 | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |
| FT-20 | 1 | azul | 0,83 | 0,59<br>0,48 | — | — | — | 0,66<br>0,55 | — |

Legenda:
$Rf_a$ — Rf da amostra
$Rf_p$ — Rf do padrão
$Rf_p$ { (Rf maior — aflatoxina B1 — azul
(Rf menor — aflatoxina G1 — verde
Mf — Número de manchas fluorescentes
Tf — Tonalidade da fluorescência
[ ] — Rf da amostra eluída que foi submetida à espectrofotometria

QUADRO II

Isolamento de fungos das amostras de farinha de trigo

| Designação | Fungos isolados | Designação | Fungos isolados |
|---|---|---|---|
| FT-1 | Leveduras | FT-12 | Ficomicetos |
| FT-2 | Ficomicetos | FT-13 | Ficomicetos |
| FT-3 | Ficomicetos | FT-14 | Ficomicetos<br>*Aspergillus* sp |
| FT-4 | Ficomicetos | FT-15 | Ficomicetos<br>*Aspergillus* sp |
| FT-5 | Leveduras | FT-16 | Ficomicetos<br>*Aspergillus* sp |
| FT-6 | Ficomicetos | FT-17 | —— |
| FT-7 | Leveduras | FT-18 | *Aspergillus* sp |
| FT-8 | Ficomicetos | FT-19 | Leveduras |
| FT-9 | Leveduras | FT-20 | *Aspergillus* sp |
| FT-10 | Ficomicetos<br>*Aspergillus* sp | | |
| FT-11 | Ficomicetos | | |

QUADRO III

Resultados obtidos através da cromatografia dos extratos dos meios de cultivo de *Aspergillus* sp isolados de farinha de trigo

| Extratos | Método cromatográfico | | | | | | | | Presença de aflatoxina B1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | | | | 2 | | | | |
| | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | |
| FT-X | 4 | azul<br>azul<br>verde<br>verde | 0,70<br>0,49<br>0,22<br>0,11 | 0,65<br>0,55 | 3 | azul<br>azul<br>azul | $\boxed{0,76}$<br>0,36<br>0,17 | 0,69<br>0,58 | ± |
| FT-XIV | 3 | azul<br>azul<br>azul | 0,73<br>0,50<br>0,38 | 0,65<br>0,55 | 2 | azul<br>azul | $\boxed{0,80}$<br>0,56 | 0,69<br>0,58 | ± |
| FT-XV | — | — | — | 0,65<br>0,55 | — | — | — | 0,69<br>0,58 | − |
| FT-XVI | 2 | azul<br>azul | 0,80<br>0,30 | 0,65<br>0,55 | 2 | azul<br>azul | 0,82<br>0,51 | 0,69<br>0,58 | ± |
| FT-XVIII | 3 | azul<br>azul<br>azul | 0,80<br>0,50<br>0,41 | 0,65<br>0,55 | 3 | azul<br>azul<br>azul | 0,85<br>$\boxed{0,70}$<br>0,58 | 0,69<br>0,58 | + |
| FT-XX | — | — | — | 0,65<br>0,55 | — | — | — | 0,69<br>0,58 | − |

QUADRO IV

Resultados obtidos da cromatografia, utilizando os sistemas 3, 4, 5 e 6, dos extratos de farinha de trigo considerados suspeitos ou prováveis em aflatoxina B-1, pelos métodos utilizados

| Extratos | Método cromatográfico | | | | | | | | Presença de aflatoxina B1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 3 | | | | 4 | | | | |
| | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | Mf | Tf | $Rf_a$ | $Rf_p$ | |
| FT-3 | 1 | azul | 0,41 | 0,43<br>0,30 | 1 | azul | 0,60 | 0,57<br>0,40 | + |
| FT-15 | 2 | azul<br>verde | 0,40<br>0,25 | 0,43<br>0,30 | 2 | azul<br>verde | 0,54<br>0,35 | 0,57<br>0,40 | + |
| FT-X | 3 | azul<br>verde<br>verde | 0,37<br>0,25<br>0,05 | 0,43<br>0,30 | 1 | azul | 0,55 | 0,57<br>0,40 | + |
| FT-XVI | 2 | azul<br>verde | 0,40<br>0,17 | 0,42<br>0,25 | 1 | azul | 0,52 | 0,53<br>0,35 | + |
| | 5 | | | | 6 | | | | |
| FT-3 | 1 | azul | 0,85 | 0,87<br>0,66 | 1 | azul | 0,86 | 0,87<br>0,66 | + |
| FT-15 | 2 | azul<br>verde | 0,87<br>0,67 | 0,87<br>0,66 | 2 | azul<br>verde | 0,87<br>0,67 | 0,87<br>0,66 | + |
| FT-X | 3 | azul<br>verde<br>verde | 0,83<br>0,70<br>0,50 | 0,87<br>0,66 | 2 | azul<br>verde | 0,85<br>0,63 | 0,87<br>0,66 | + |
| FT-XVI | 2 | azul<br>verde | 0,85<br>0,50 | 0,81<br>0,58 | 2 | azul<br>verde | 0,90<br>0,68 | 0,90<br>0,67 | + |

QUADRO V

Resultados finais obtidos pela comparação de diversos métodos utilizados na pesquisa da aflatoxina B-1, em farinha de trigo

| Extrato | Método cromatográfico — 2 | Espectrofotometria | Método cromatográfico | | Resultados finais | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 4 | 6 | Presença de aflatoxina B-1 | Concentração (mg/100 g da amostra) |
| FT-3 | + | + | + | + | + | 1,84 |
| FT-15 | + | (±) | + | + | + | 0,36 |
| FT-X | (±) | (±) | + | + | (±) | |
| FT-XIV | (±) | — | NR | NR | — | |
| FT-XVI | (±) | (±) | + | + | (±) | |
| FT-XVIII | + | — | NR | NR | — | |

muito próximos (diferença até 0,05) pelo método cromatográfico-2, o extrato foi considerado positivo. Quando encontramos diferença acima de 0,05 consideramos suspeitos. Como podemos observar, algumas manchas fluorescentes desapareceram no método cromatográfico-2, como se pode notar no Quadro I, nos extratos descritos sob as designações FT-6, FT-8, FT-12, FT-14, FT-15, FT-16, FT-17, FT-18, FT-19 e FT-20.

Nas 20 amostras de farinha de trigo estudadas conseguimos isolar seis *Aspergillus* sp. Também em seus extratos houve desaparecimento de manchas fluorescentes em FT-X e FT-XIV, aparecendo novas manchas em FT-X (Quadro III).

No método cromatográfico-4 evidenciou-se o desaparecimento de algumas manchas fluorescentes (extratos FT-X e FT-XIV), assim

TABELA I

Absorbâncias das soluções contendo substâncias fluorescentes isoladas de extratos de farinha de trigo, pela cromatografia

| λ (mμ) | 250 | 260 | 270 | 300 | 350 | 360 | 370 | 400 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | | | | | | | | |
| FT-3 | 0,310 | 0,205 | 0,145 | 0,112 | 0,350 | 0,355 | 0,325 | 0,240 |
| FT-15 | 0,092 | 0,042 | 0,036 | 0,028 | 0,026 | 0,026 | 0,026 | 0 |

TABELA II

Absorbâncias das soluções de manchas fluorescentes obtidas pela cromatografia dos padrões qualitativo e quantitativo de aflatoxina B-1 nas concentrações de 12,5 μg/ml e 25 μg/ml

| λ (mμ) | 250 | 260 | 270 | 300 | 350 | 360 | 370 | 400 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Amostra | | | | | | | | |
| Padrão qualitativo | 0,046 | 0,034 | 0,022 | 0,010 | 0,002 | 0,006 | 0,004 | 0,002 |
| Padrão quantitativo | 0,084 | 0,069 | 0,046 | 0,006 | 0,020 | 0,028 | 0,012 | 0 |

TABELA III

Absorbâncias de soluções contendo diferentes concentrações do padrão quantitativo de aflatoxina B-1

| λ (mμ) | 250 | 260 | 270 | 300 | 350 | 360 | 370 | 400 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentração (γ/5 ml) | | | | | | | | |
| 10 | 0,068 | 0,092 | 0,064 | 0,024 | 0,185 | 0,200 | 0,150 | 0 |
| 5 | 0,036 | 0,050 | 0,034 | 0,012 | 0,100 | 0,105 | 0,080 | 0 |
| 1 | 0,018 | 0,016 | 0,010 | 0 | 0,020 | 0,026 | 0,018 | 0 |
| 0,5 | 0,040 | 0,032 | 0,020 | 0,010 | 0,012 | 0,016 | 0,012 | 0 |
| 0,25 | 0,018 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

TABELA IV

Absorbâncias das soluções de manchas fluorescentes obtidas pela cromatografia de diferentes concentrações do padrão quantitativo de aflatoxina B-1

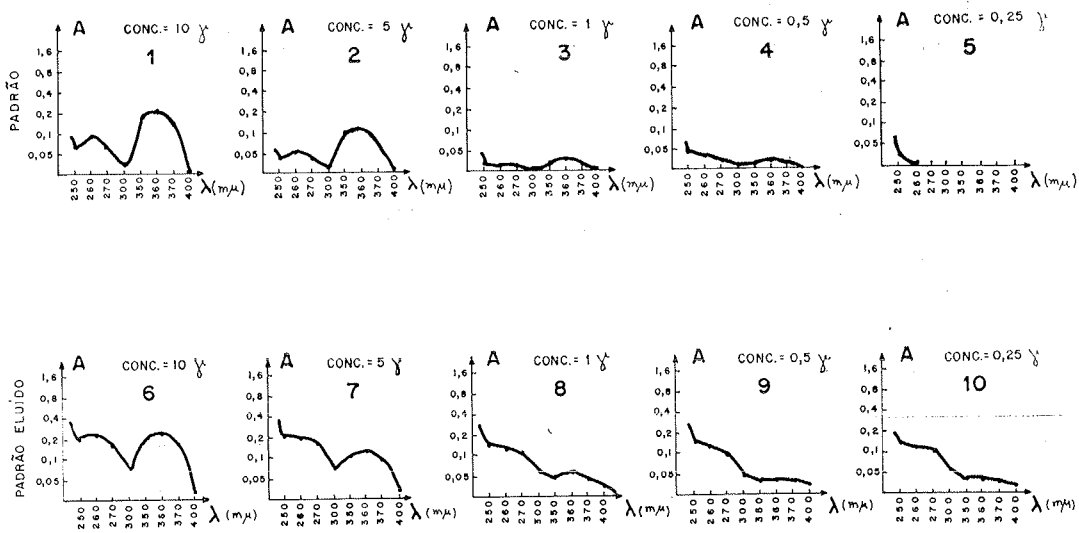
| λ (mμ) | 250 | 260 | 270 | 300 | 350 | 360 | 370 | 400 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Concentração (γ/5 ml) | | | | | | | | |
| 10 | 0,205 | 0,210 | 0,170 | 0,082 | 0,205 | 0,215 | 0,180 | 0,028 |
| 5 | 0,210 | 0,200 | 0,175 | 0,068 | 0,105 | 0,120 | 0,016 | 0,012 |
| 1 | 0,145 | 0,125 | 0,115 | 0,060 | 0,048 | 0,052 | 0,044 | 0,024 |
| 0,5 | 0,160 | 0,135 | 0,115 | 0,050 | 0,038 | 0,038 | 0,036 | 0,034 |
| 0,25 | 0,150 | 0,130 | 0,115 | 0,058 | 0,034 | 0,034 | 0,030 | 0,024 |

como no método cromatográfico-6 em FT-X (Quadro IV).

As diferentes soluções obtidas foram analisadas espectrofotomètricamente, tanto as puras como as submetidas à cromatografia. Pelas Tabelas III e IV e nas Figs. 1 a 10, podemos verificar que de fato, tanto no padrão puro como no eluído, o primeiro pico (260 mμ) desapareceu com a diminuição da concentração. No padrão puro na concentração de 1 γ/5 ml e no eluído já na de 5 γ/5 ml. Quanto ao pico em 360 mμ, no padrão puro persistiu até a concentração de 0,5 γ/5 ml e no eluído até 1 γ/5 ml. Nas duas concentrações subseqüentes obtivemos um platô nas regiões de 350 e 360 mμ. Assim, consideramos as amostras, com platô em 360 e 370 mμ (FT-15, FT-X, FT-XVI) como suspeitas, por êste método.

Pelo Quadro geral comparativo (V) dos resultados obtidos, deduzimos que apenas as amostras FT-3 e FT-15 continham aflatoxina B-1, e como resultados suspeitos ou prováveis FT-X e FT-XVI.

Como as leituras espectrofotométricas indicaram valôres baixos de absorbâncias, fato êste que, apesar da grande sensibilidade do espectrofotômetro utilizado, induz a êrro, apresentamos as concentrações obtidas como aproximadas.




Figs. 1 a 5 — Espectro de absorção das soluções metanólicas do padrão quantitativo de aflatoxina B1 (Espectrofotômetro Zeiss mod. PMQ II). (Concentração: γ/5 ml)

Figs. 6 a 10 — Espectro de absorção das soluções metanólicas do padrão quantitativo de aflatoxina B1, eluído de cromatograma (Espectrofotômetro Zeiss mod. PMQ II). Concentração: γ/5 ml)

## DISCUSSÃO

A técnica de PONS Jr. & col. [10] associada à de NABNEY & NESBITT [9], a nosso ver, foi extremamente satisfatória pois, se de um lado a primeira fornece método extrativo eficiente e rápido, a segunda propiciou-nos ótimos resultados através da purificação dos extratos com éter etílico nas próprias placas de cromatografia. Estas, após o desenvolvimento daquele solvente, apresentaram-se limpas e pràticamente isentas de substâncias interferentes, que se localizaram no "front".

Já de algum tempo, sabe-se que existem substâncias fluorescentes interferentes que podem induzir a interpretações errôneas na detecção das aflatoxinas. Verificou-se que, por exemplo, diversos compostos fluorescentes comportam-se à cromatografia de maneira semelhante às aflatoxinas. Quando eluídos e analisados quìmicamente apresentam estrutura semelhante ao flavacol, ao ácido aspergílico e a produtos de condensação de duas moléculas de aminoácidos como a leucina e iso-leucina [12].

Esta foi uma das razões que nos levou ao emprêgo do éter etílico a fim de verificarmos o comportamento destas substâncias fluorescentes frente àquele solvente.

NABNEY & NESBITT [9] recomendam o método espectrofotométrico para determinação de concentrações altas de aflatoxina (5 $\mu$g e 10 $\mu$g, para mais). Todos os nossos extratos, com exceção de um (FT-3), apresentaram uma constante qual seja a formação de platôs nas regiões de 350, 360, e 370 m$\mu$. Pela experiência por nós realizada com os padrões diluídos parece-nos que isto ocorra em concentrações baixas. Apesar da margem de êrro maior em leituras de concentrações baixas, queremos acreditar que o método espectrofotométrico continua apresentando, nêstes casos, valor diagnóstico pois a formação dêstes platôs parece-nos característica.

A nosso ver, o método cromatográfico-2 deve sempre preceder à espectrofotometria para assegurar maior precisão diagnóstica.

Quanto ao meio de cultura, ou seja, o denominado YES por DAVIS & col. [2], além de propiciar a produção de quantidades apreciáveis de aflatoxina pelos *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*, é econômico e de fácil manipulação pois em sua composição entram, tão sòmente, sacarose a 20% e extrato de levedura a 2%. Como podemos observar no Quadro V, nem tôdas as manchas fluorescentes consideradas positivas pelo método cromatográfico-2, foram positivas pelo método espectrofotométrico, como, por exemplo, no extrato FT-XVIII e nos extratos considerados suspeitos como o FT-XIV. Portanto, parece que o método cromatográfico-2 não confere resultados definitivos.

Em outras oportunidades apareceram novas manchas fluorescentes que explicaríamos pelo desdobramento das já existentes ou, em alguns casos, pelo desenvolvimento de manchas que teriam permanecido no ponto de partida do cromatograma.

Como podemos notar no Quadro V, quando a espectrofotometria foi negativa, não realizamos os métodos cromatográficos 3, 4 e 5, 6. Nos casos suspeitos continuamos a análise a fim de obter maiores elementos para avaliação final. Mesmo assim, obtivemos dois resultados duvidosos ou prováveis em aflatoxina B-1 ou sejam FT-X e FT-XVI.

Nossa primeira impressão é que seja um bom resultado mesmo porque existe a possibilidade, num laboratório de contrôle, de extrair maiores quantidades do material em estudo, aumentando, conseqüentemente, a concentração da substância fluorescente. Convém ressaltarmos a necessidade de maior número de experimentações para uma afirmativa em bases mais sólidas.

Através o trabalho de NABNEY & NESBITT [9], sabemos que os limites de confiança, para o método espectrofotométrico empregado em concentrações de 5 $\mu$g e 10 $\mu$g de aflatoxina B-1, são de 95%. Em nossas amostras apenas a descrita sob designação FT-3 enquadrou-se nesses limites, pois sua concentração no extrato cromatografado foi 9,22 $\mu$g em 0,1 ml. Adotar, portanto, critério semi-quantitativo é norma prudente na análise de aflatoxina, em baixas concentrações, através dos métodos analíticos até agora conhecidos.

Pode-se afirmar ainda que não houve correlação entre farinhas de trigo contaminadas por aflatoxina com amostras toxigênicas de *Aspergillus* sp. As amostras de fungos descritas sob as designações FT-X e FT-XVI consideradas suspeitas não produziram aflatoxina nos respectivos alimentos dos quais foram isoladas. Quanto às amostras positivas, em que não foi isolado o fungo produtor do princípio tóxico, pode-se imaginar que no moinho devam ser misturados diversos lotes de trigo de diferentes procedências e que

portanto, são contaminados pela aflatoxina e os esporos dos *Aspergillus* sp distribuem-se pelo todo do alimento não sendo mais isolados em algumas amostras. Pode haver ainda migração da aflatoxina do local de contaminação do *Aspergillus* sp como demonstrado no trabalho de FRANK [4].


## SUMMARY

*Search of aflatoxin B-1 and similar fluorescent compounds in wheat flour*

Some modifications in the method of PONS Jr. et al. [10] were suggested for a quicker and better technique for the detection of aflatoxin. Such modifications consisted in purifying the extracts with ethilic ether in the chromatographic plate to maintain a good sensitivity, as described by NABNEY & NESBITT [9].

Twenty samples of wheat-flour were analysed with this simple technique using spectrophotometry in the ultraviolet region as well as two different systems of solvents in thin layer chromatography. The mycotoxin was detected in two samples of the analysed material (1.84 and 0.36 mg/100 g). At the same time, the incidence of *Aspergillus* sp in this food and the eventual production of aflatoxin B-1 by them was also studied. The classification of the *Aspergillus* was made only in genera and it was possible to observe that there was no correlation between the presence of aflatoxin B-1 and the existence of these fungi in the substrata.

Several aspects of the existence of fluorescent spots similar to aflatoxin were also studied and it was verified that they were present in a large number of samples. Such findings, however, do not permit us to consider as positive (aflatoxin producer) two cultures of *Aspergillus* sp because the methods used for the differentiation were not sufficient for a definitive conclusion.


## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. ALLCROFT, R. & CARNAGHAN, R. B. A. — Groundnut toxicity: an examination for toxin in human food products from animals fed with toxic groundnut meal. *Vet. Rec.*, **75**:259-263, 1963.

2. DAVIS, N. D.; DIENER, U. L. & ELDRIDGE, D. W. — Production of aflatoxin B1 and G1 by *"Aspergillus flavus"* in a semisynthetic medium. *Appl. Microbiol.*, **14**:378-380, 1966.

3. DICKENS, R. & JONES, H. E. H. — The carcinogenic action of aflatoxin after its subcutaneous injection in the rab. *Brit. J. Cancer*, **17**:691-698, 1963.

4. FRANK, H. K. — Diffusion of aflatoxin in foodstuffs. *J. Food Sci.*, **33**:98-100, 1968.

5. GOLDBLATT, L. A. — Aflatoxin and its control. *Econ. Botany*, **22**:51-52, 1968.

6. HARTLEY, R. D.; NESBITT, B. F. & O'KELLY, J. — Toxic metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* (London), **198**:1056-1058, 1963.

7. HESSELTINE, C. W.; SHOTWELL, O. L.; ELLIS, J. J. & STUBBLEFIELD, R. D. — Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. *Bact. Rev.*, **30**:795-805, 1966.

8. MORAES, G. W. G. de — Estudos sôbre a aflatoxina. I. Revisão bibliográfica. *Arq. Esc. Vet.*, **16**:281-317, 1964.

9. NABNEY, J. & NESBITT, B. F. — A sprectrophotometric method for determining the aflatoxins. *Analyst*, **90**:155-160, 1965.

10. PONS Jr., W. A.; CUCULLU, A. F.; LEE, L. S.; ROBERTSON, J. A.; FRANZ, A. O. & GOLDBLATT, L. A. — Determination of aflatoxins in agricultural products: use of aqueous acetone for extraction. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **49**:554-562, 1966.

11. SPENSLEY, P. C. — Aflatoxin the active principle in turkey × disease. *Endeavour.*, **22**: 75-79, 1963.

12. YOKOTSUKA, T.; SASAKI, M.; KIKUCHI, T.; ASAO, Y. & NOBUHARA, A. — Production of fluorescent compounds other than aflatoxins by Japanese industrial molds. *In* MATELES, R. I. & WOGAN, G. N. — *Biochemistry of some foodborne microbial toxins.* Cambridge, The M.I.T. Press., 1967, págs. 131-152.


---

Recebido para publicação em 24/4/1970.

*Rev. Microbiol.*
*1(1):43-60, julho-setembro, 1970*

# DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DA TUBERCULOSE

Laerte de ANDRADE [1]

**RESUMO**

Foi feita uma revisão dos métodos de diagnóstico das infecções causadas pelo bacilo da tuberculose. São apresentados e discutidos os processos de colheita, conservação e transporte de material, o exame microscópico, o cultivo do agente, sua identificação e a investigação da sensibilidade a drogas. A revisão inclui ainda um apêndice contendo as técnicas mais comumente utilizadas no trabalho de rotina com o bacilo da tuberculose e outras micobactérias.

## INTRODUÇÃO

O diagnóstico bacteriológico das doenças infecto-contagiosas necessita constantemente ser atualizado devido à introdução de novos métodos de trabalho. A tuberculose não foge à regra. É o que vamos tentar fazer de maneira resumida e prática, sem grandes explanações teóricas, mas com uma metodologia que permita aos bacteriologistas um melhor padrão de trabalho.

A confirmação bacteriológica da tuberculose é feita obedecendo-se a uma seqüência de operações de complexidade progressiva, de acôrdo com o equipamento e pessoal disponível nos laboratórios de vários níveis. É evidente que cada etapa cumprida representa um progresso na segurança do diagnóstico e no sucesso terapêutico. Informação será dada sôbre os tipos de exames mais recomendados no início e durante o tratamento, bem como nas comprovações de cura.

O exame bacteriológico se inicia com a colheita de material do paciente. Normas gerais serão dadas para que êsse material chegue ao laboratório em condições satisfatórias, de modo a permitir o isolamento e identificação das micobactérias eventualmente presentes.

A primeira fase é o exame microscópico direto que, pela sua simplicidade e rapidez, tem muita importância no diagnóstico e no contrôle terapêutico. Por isto deve ser executado com o máximo rigor, reduzindo-se ao mínimo, as suas várias causas de êrro. Nos laboratórios sem grandes recursos é o único possível. Basta uma bateria de corantes e um microscópio. As técnicas de homogeneização e concentração, embora de valor discutível, podem ser usadas com proveito.

A cultura objetivando o isolamento e a identificação da micobactéria requer melhor aparelhagem e pessoal mais categorizado. Tem, entretanto, suas compensações, não só quanto ao esclarecimento do diagnóstico como pela possibilidade de, com um pequeno esfôrço, permitir a etapa seguinte, que é a realização dos testes de sensibilidade às drogas terapêuticas. É necessário, nesta fase, que o bacteriologista tenha certeza de que a cultura obtida é do bacilo da tuberculose, pois pode ser uma das várias espécies de micobactérias atípicas, cuja patogenicidade pode estar em causa. Uma identificação preliminar é possível pela observação de caracteres bacteriológicos e por testes bioquímicos rápidos e simples, sem necessidade de se recorrer obrigatòriamente a inoculação em animais, que são custosas e demoradas. Com o advento das drogas, muito especialmente a hidrazida, esta técnica perdeu muito do seu valor, pois as amostras que se tornam resistentes, perdem a capacidade de provocar a tuberculose experimental na cobaia.

Laboratório Central de Tuberculose da Guanabara, sob a direção do Dr. M. F. Maragão
(1) Do Serviço Nacional de Tuberculose e do Conselho Nacional de Pesquisa — Rio de Janeiro, GB, Brasil

A determinação da espécie de micobactéria atípica isolada, sòmente é possível em laboratórios bem equipados. São os chamados Laboratórios de Referência, que recebem as amostras dos laboratórios de diagnóstico, já selecionadas como não sendo *Mycobacterium tuberculosis*. O Laboratório Central de Tuberculose da Guanabara (L.C.T.) é credenciado pela Campanha Nacional Contra a Tuberculose para êste tipo de trabalho no Brasil.

Será dada também uma idéia geral sôbre a interpretação dos resultados, para que o médico clínico não fique no eterno dilema quanto à real importância de uma micobactéria identificada como atípica.

Na parte final desta exposição serão descritas algumas das técnicas já aprovadas na prática e que podem ser executadas por bacteriologista não especializado. Não se trata, portanto, de simples reprodução de métodos publicados em livros e revistas.

Em linhas gerais, será êste o roteiro a ser seguido nesta tentativa de atualização dos métodos mais recomendados para o diagnóstico bacteriológico da tuberculose e das infecções por micobactérias atípicas.

## I — *Exames bacteriológicos no curso da doença*

Na tuberculose é importante saber-se quais os exames a serem feitos no início da doença (diagnóstico), no curso do tratamento (contrôle terapêutico) e no final (provas de cura). São as recomendações de CANETTI & GROSSET [3].

1) *Antes do tratamento* — Pesquisa do bacilo pelo exame direto ou cultura e determinação da resistência às drogas terapêuticas. Inicialmente, a pesquisa é feita pelo exame microscópico e a cultura, se possível, com três colheitas sucessivas com 24 horas de intervalo. O isolamento da bactéria antes do início do tratamento é importante, não só para o diagnóstico como para a determinação da resistência, da qual depende o esquema de tratamento. A resistência pode ser determinada pelo método direto se o escarro mostrar número significativo de bacilos ou pelo método indireto, a partir da cultura inicial, quando o escarro é pobre em bacilos ou negativo ao exame direto. Investigação deve ser feita para saber-se:

a) se o doente nunca foi tratado: êle pode ter se infetado com amostra resistente (resistência primária). É freqüente a resistência a uma ou mais drogas de 1.ª linha (SM, INH e PAS) em amostras isoladas de doentes não tratados;

b) se o doente foi tratado anteriormente: nêste caso o doente é passível de ser portador de amostra resistente a uma ou várias drogas. O teste de resistência deve ser feito com os antibióticos de 1.ª linha ou com outras drogas, especialmente com as que foram aplicadas no doente. Se o exame direto fôr negativo, deve-se repetir a colheita três dias seguidos antes do início do tratamento, pois é importante que o teste seja feito em cultura obtida nesta fase.

2) *No curso do tratamento* — Visa controlar a eficácia do tratamento e permitir retificação no esquema que esteja se mostrando ineficaz:

a) *Exame microscópico* — É recomendado um exame mensal até o fim do 6.º mês, do escarro ou do lavado gástrico. Depois do 6.º mês, se o exame é negativo, pode ser feito cada dois meses. Se o tratamento é eficaz os exames sucessivos mostram rarefação progressiva até desaparecimento definitivo dos bacilos. A persistência prolongada de bacilos no escarro depois do 3.º mês, e sobretudo do 6.º mês, é sinal de ineficácia do tratamento, muito especialmente quando há aumento nítido depois de um período de rarefação. Nêste caso não se deve perder de vista a possibilidade do doente não estar tomando a medicação ou de ser o mesmo portador de uma micobactéria atípica, resistente a drogas; b) *Cultura* — Cada três meses até o final do tratamento fazer cultura, de preferência com três colheitas cada 24 horas ou uma cultura mensal com apenas uma colheita. É comum a cultura ser positiva e o exame direto ser negativo nesta fase, visto ser êste um método de menor sensibilidade para a descoberta de bacilos. Podemos também observar situações inversas, mas raramente. É completamente inútil fazer-se teste de resistência nestas culturas, salvo nos casos indicados abaixo; c) *Teste de resistência* — Êste teste é indicado no curso do tratamento em três circunstâncias: 1) Quando o tratamento é iniciado antes de ser feito o teste. Nêste caso é indicado o teste indireto. 2) Quando ocorre reaparecimento do bacilo na cultura, depois de um período de negativação mais ou menos prolongado. O teste é feito apenas para as drogas que o doente estiver tomando ou se êle já foi tratado, incluir também aquelas que tomou anteriormente. 3) Ao fim do 6.º mês, quando os

exames diretos e as culturas são permanentemente positivos ou quando há aumento da quantidade de bacilos.

3) *Ao final do tratamento* — É importante assegurar a cura bacteriológica da tuberculose com todo o rigor. Devem-se fazer três culturas com intervalo de 24 horas, usando-se, na falta de expectoração, lavado gástrico ou brônquico. Se uma dessas culturas fôr positiva, não houve cura e faz-se o teste de resistência da amostra às drogas usadas, para prosseguimento do tratamento. O caso não deve ser abandonado depois do tratamento, sendo tão importante a verificação bacteriológica quanto a radiológica, nas seguintes circunstâncias: 1) Durante o 1.º ano após a cura, fazer duas culturas, uma com 6 meses e outra com 12 meses; 2) Nos 2 anos seguintes, duas culturas, com 24 meses e outra com 36 meses; 3) Quando de alterações do estado geral, infecções persistentes das vias respiratórias ou modificações das imagens radiológicas.

## II — *Colheita, conservação e transporte de materiais patológicos*

A natureza do material a ser examinado varia com a forma clínica da doença, assim como os cuidados na colheita variam com a natureza do exame solicitado, com o material e com a situação do doente. As colheitas feitas em doentes hospitalizados são mais eficientes do que as feitas à domicílio. Se vai ser feita apenas a microscopia, os cuidados são menos rigorosos quanto à contaminação por outros germes. Entretanto, devem ser evitadas contaminações dos recipientes por materiais positivos para o bacilo da tuberculose ou para micobactérias afins.

São os seguintes os materiais mais comumente colhidos:

*Escarro* — Visto ser a tuberculose pulmonar a forma clínica mais freqüente, o escarro é também o material mais examinado. O doente deve ser instruído no sentido de colher apenas a expectoração e não saliva ou secreções naso-faringeanas, de preferência pela manhã, em frasco de vidro estéril de bôca larga. Nos doentes hospitalizados, a colheita pode ser feita em copos ou caixas de cartolina parafinada, que são usadas uma só vez e depois incineradas. Os recipientes de vidro que serão usados novamente devem ser tratados com solução detergente a fim de evitar a permanência de bacilos residuais de exames positivos anteriores. Os exames negativos devem ser repetidos com colheitas em dias sucessivos.

Nos doentes que não expectoram a colheita é feita por um dos seguintes métodos:

*Lavado gástrico* — Visa colher mucosidades brônquicas deglutidas durante o sono. Logo, deve ser feita pela manhã. A antiga sonda de borracha está sendo substituída por material plástico usado uma só vez. Uma boa tubagem gástrica deve ser feita no domicílio ou com o doente hospitalizado, pois o simples deslocamento do doente de casa para o laboratório é suficiente para o esvasiamento gástrico.

*Lavado brônquico* — Pode substituir o lavado gástrico pela sua maior simplicidade. Visa fazer o doente expectorar artificialmente por meio de lavagem brônquica com salina após anestesia local laringeana. A colheita pode ser feita ainda por aspiração brônquica no curso de broncoscopia ou por expectoração provocada por aerosol.

*"Swab" laringeano* — Visa recolher mucosidades de origem brônquica presentes no laringe. É a técnica ideal para crianças ou pessoas que não expectoram espontâneamente. Se o material não é abundante deve ser repetida a colheita em vários dias.

*Outros materiais* — Em sua maioria, são materiais pobres em bacilos e devido a isto, o procedimento é diferente. Se se trata de material sem contaminação múltipla, deve ser colhido assèpticamente em tubo ou balão autoclavado, para permitir a semeadura direta nos meios de cultura. Estão nesta categoria: líquor, líquido pleural, peritoneal, articular, etc. Os materiais sabidamente contaminados por outra flora (urina, pus de abscessos fistulisados, etc.) embora não exijam os mesmos cuidados, devem ser tratados antes da cultura. No caso da urina, deve ser colhida a primeira da manhã, em vez da de 24 horas. Dada a pobreza em bacilos, o exame deve ser repetido três dias seguidos.

*Conservação e transporte* — O problema do transporte está muito relacionado ao da conservação, que visa impedir o desenvolvimento dos germes contaminantes e preservar a viabilidade das micobactérias. Nem sempre é possível fazer-se o exame no mesmo local da colheita. Isto se refletiria na eficácia do exame se cuidados especiais não forem tomados. Não há substância capaz de con-

servar o material patológico contaminado deixando viável o bacilo da tuberculose por vários dias. O melhor meio ainda é a refrigeração. Quando não se dispõe dela, pode-se usar a técnica difásica, isto é, purificação e semeadura do material no local da colheita, transporte ao abrigo da luz e das temperaturas muito elevadas e incubação ao chegar ao laboratório. Esta técnica foi idealizada por nós e aplicada com sucesso em materiais colhidos de índios.

III — *Exame microscópico*

A pesquisa do bacilo da tuberculose faz-se após coloração, utilizando-se métodos que visam evidenciar o seu caráter fundamental que é a álcool-ácido resistência, isto é, a resistência ao descoramento pelo álcool acidificado quando corado à quente pela fucsina. Entretanto, esta não é uma propriedade exclusiva do bacilo da tuberculose, podendo surgir outros microrganismos pertencentes ou não ao gênero *Mycobacterium* nos materiais patológicos, cuja diferenciação sòmente é possível com a cultura. Também, dependendo da sua fase de desenvolvimento, as micobactérias podem apresentar-se não álcool-ácido-resistentes. O bacilo da tuberculose apresenta-se como bastonetes retos ou ligeiramente curvos, com granulações citoplasmáticas, não ramificados, sem conídios ou esporos.

A coloração de Ziehl-Neelsen é ainda o método de rotina mais usado nos laboratórios de tuberculose. Seu valor depende muito dos cuidados técnicos empregados, desde o preparo do esfregaço até o exame microscópico. É de interêsse clínico que os resultados sejam expressos quantitativamente após contagem bacilar. Visa informar o número de bacilos por campo, pois isto tem importância não só diagnóstica como terapêutica, e nisso se baseia o clínico em caso de contrôle mensal.

O uso do exame direto como meio de diagnóstico deve ser difundido ao máximo nas localidades onde não se possam utilizar outros métodos mais seguros. O seu valor é porém limitado, pois a positividade é baixa nos materiais paucibacilares, não permite assegurar que se trata de bacilo da tuberculose ou de outra micobactéria e nem fazer-se o teste de sensibilidade às drogas, informação importante na orientação terapêutica. Quando não se dispõe dêste dado, o recurso é iniciar a aplicação das drogas, fazer o contrôle pela bacterioscopia e ao fim de algumas semanas, caso não haja negativação, concluir pela resistência.

Nos laboratórios de grande movimento pode-se usar com proveito a microscopia fluorescente, que consiste em corar o bacilo por um fluorocromo, ou seja, substância que se torna fluorescente quando exposta a uma luz excitante de comprimento de onda apropriado. A vantagem mais notável desta técnica é a sua rapidez. Dado o custo da aparelhagem o seu uso só se justifica em laboratórios de grande movimento, com 30 a 50 exames microscópicos por dia. O seu rendimento está também correlacionado à qualificação do técnico microscopista. A positividade é bem mais elevada do que a obtida com o método de Ziehl-Neelsen. Há ainda a vantagem de se poder corar a mesma lâmina, primeiro com a auramina e em caso de dúvida, pela fucsina.

IV — *Cultura simples*

O isolamento e identificação do bacilo da tuberculose é feito por cultivo em meio enriquecido onde cresce muito lentamente (15 a 30 dias) dando origem a colônias de aspecto característico. O meio mais usado é o de Lowenstein-Jensen à base de ôvo e glicerina.

O procedimento varia com a natureza do material patológico. *Material não contaminado*: quando se trata de material sem contaminantes, colhido assèpticamente, a semeadura deve ser feita diretamente no meio, com ou sem centrifugação (líquor, exsudatos, material de punções ganglionares, etc.). Geralmente trata-se de material paucibacilar, tornando-se mais difícil a obtenção de culturas positivas, tanto mais que parte das micobactérias é destruída durante o processo de depuração. É suficiente semear 0,5 ml com pipeta Pasteur, deixar secar, arrolhar e incubar a 37°C. O líquor deve ser semeado sem centrifugação. Os exsudatos pleurais, se contêm coágulos fibrinosos, êstes podem ser semeados. Os produtos sólidos devem ser triturados em gral com areia e diluídos em água destilada antes da semeadura.

*Material contaminado* — O isolamento do bacilo da tuberculose do escarro necessita: a) descontaminação prévia da expectoração; b) semeadura em meio enriquecido.

A descontaminação prévia pode ser obtida pela adição de soda, fosfato trissódico ou compostos tensio-ativos, que visam a elimi-

nação da flora microbiana associada, uma vez que esta é mais sensível do que o bacilo da tuberculose a estas substâncias. Êstes produtos, além do poder antisséptico muito acentuado, têm também a propriedade de liquefazer o muco, facilitando o contato com as bactérias contaminantes. O tempo de ação dêstes agentes varia com a concentração, que por sua vez varia com a provável contaminação dos materiais patológicos. Para os materiais destituídos de muco, o ácido sulfúrico pode ser usado em solução a 15% durante 30 minutos para os muito contaminados e a 4% durante 10-15 minutos para os pouco contaminados. Deve ser usado para urina, fragmentos de tecidos, etc.

O procedimento com o lavado gástrico é idêntico ao do escarro, sendo precedido de centrifugação ou coleta da mucosidade com pipeta, dado o volume maior de líquido.

*Meios de cultura* — Os meios de cultura usados para isolamento e posterior estudo das micobactérias têm em sua composição, asparagina como fonte de nitrogênio, glicerina, como fonte de carbono, sais minerais e ôvo. O meio de Lowenstein-Jensen que é universalmente usado leva, ainda, verde malaquita que serve como inibidor dos germes contaminantes. Sempre que possível, é recomendada a semeadura de materiais provenientes de lesões não pulmonares em outros meios de cultura. Nos Estados Unidos está sendo muito usado o meio semi-sintético 7H10, que é mais caro do que o Lowenstein-Jensen, porém mais sensível. Tem ainda a vantagem de permitir o estudo da morfologia das colônias, o que não só proporciona um diagnóstico mais precoce, como informa sôbre a espécie isolada. Runyon, em recente visita ao L.C.T., revelou grande esperança nesta técnica como auxiliar na determinação precoce das espécies de micobactérias mais comumente isoladas do homem. Dentre os meios líquidos, o meio de Sula tem sido empregado também para isolamento do bacilo da tuberculose, com relativo sucesso.

*Exame das culturas* — As culturas são examinadas após 48 horas para surpreender contaminações que alcalinizam o meio de L.J. tornando-o amarelado ou o acidificam, intensificando a côr verde ou ainda liquefazendo-o pela ação de germes proteolíticos. Depois de dois dias os tubos podem ser arrolhados, desde que o inóculo líquido se tenha evaporado. Algumas vêzes já se nota o aparecimento de colônias de micobactérias de crescimento rápido (Grupo IV). A partir de 10 a 14 dias as colônias do bacilo da tuberculose começam a aparecer como pontos minúsculos, visíveis à lupa. A partir do 21.º dia as culturas são bem visíveis a ôlho nú. Os tubos negativos são mantidos na estufa pelo menos dois meses, e segundo Canetti, até quatro meses.

Ao bacteriologista experimentado era facultado identificar uma colônia de *M. tuberculosis* pelo seu aspecto macroscópico, sendo dispensada a verificação da álcool-ácido-resistência. Entretanto, com a importância que as micobactérias atípicas estão assumindo na patologia humana, há possibilidade de confusão. As colônias de bacilo da tuberculose apresentam-se de côr creme-beije, rugosas, salientes, com aspecto de couve-flôr, sem modificação do meio de cultura. As colônias de *M. bovis* são de superfície lisa, mal desenvolvidas e por isto chamadas disgônicas. As colônias atípicas são submetidas à coloração de Ziehl para que possam ser identificadas como micobactérias.

A exemplo da microscopia, é importante expressar quantitativamente, o crescimento. Os critérios são muito variáveis, sendo o mais usado:

menos de 100 colônias: dar o número real de colônias

colônias separadas, mas incontáveis: +

colônias confluentes, mas visíveis: ++

colônias confluentes, formando tapete: +++

É normal a observação de tubos contaminados por outras bactérias ou por cogumelos. Isto pode decorrer de falhas no processo de descontaminação ou pela existência de microrganismos resistentes ao agente purificador. Nêstes casos, é preciso repetir o exame deixando agir por mais tempo o agente purificador ou tentar reisolar o bacilo da cultura contaminada. Se a contaminação é bacteriana, tratar pelo ácido sulfúrico a 15% as colônias trituradas em gral durante 25 minutos e depois neutralizar com soda a 30% em presença de tintura de tornassol. Se a contaminação é por cogumelos, tratar pela soda a 6% durante 45 minutos a 37°C e neutralizar com ácido sulfúrico.

As culturas simples, assim como as dos tubos-testemunhos dos testes de sensibilidade, são identificadas por métodos bacteriológicos e bioquímicos.

V — *Cultura com teste de sensibilidade*

Êste teste visa determinar a sensibilidade da amostra às drogas terapêuticas em uso na ocasião. Estas drogas são atualmente classificadas em drogas de 1.ª linha (estreptomicina, isoniazida e PAS), drogas de 2.ª linha (cicloserina, etionamida e kanamicina) e finalmente as chamadas drogas recentes (etambutol e rifampicina), além de outras drogas que possam eventualmente estar em uso (pirazinamida, viomicina, $TB_1$, capreomicina, etc.).

O conceito de amostra resistente é o mesmo para tôdas as drogas: é aquela que tem a capacidade de crescer em presença de concentrações elevadas de uma droga. É um conceito puramente bacteriológico, uma vez que, em certos casos de resistência baixa, pode-se obter ação terapêutica com essas drogas, embora menos eficiente. Não só as concentrações, mas as proporções críticas variam de uma droga para outra, de acôrdo com critérios estabelecidos experimentalmente. Êstes critérios têm sido revistos periòdicamente pelos especialistas, com base em inquéritos internacionais, promovidos pela U.I.C.T.

No Laboratório Central de Tuberculose da Guanabara é usado desde 1963 o método das proporções de Canetti, Rist e Grosset (variante simplificada) suficientemente exato para fins práticos [2]. Êste método consiste em se medir a proporção de bacilos resistentes existente na amostra de cultura de bacilo da tuberculose em relação ao número total de bacilos semeados, o que se obtém semeando diluições a intervalos de $10^{-2}$ das amostras. É indispensável que com estas diluições se obtenham colônias isoladas em número contável. Confrontando o número de colônias que crescem no tubo com drogas (resistentes) com o número obtido nos tubos sem drogas (testemunho com a população total) obtém-se fàcilmente a proporção de bacilos resistentes existente na amostra testada.

Há duas modalidades de testes de sensibilidade: *Método direto*, rápido, quando se semeia o material patológico diretamente no meio com as drogas. É indicado para os escarros positivos ao exame direto, os quais são diluídos de acôrdo com o número de bacilos por campo. Estas diluições são determinadas na prática, pois variam com os métodos de purificação usados.

No L.C.T. está em uso o método de DARZINS [4], com as seguintes diluições:

**Microscopia**

| Número de bacilos | Código |
|---|---|
| Menos 1 b./10 campos | + |
| 1-10 b./10 campos | + + |
| 1-10 b./campo | + + + |
| Mais 10 b./campo | + + + + |

**Meio de cultura**

| Bateria A | Bateria B |
|---|---|
| Sem diluição | 1:10 |
| Sem diluição | 1:100 |
| Sem diluição | 1:1000 |
| Sem diluição | 1:10000 |

As diluições da Bateria B devem dar menos de 100 colônias nos tubos testemunhos. Os materiais negativos ao exame direto são semeados no meio sem droga para posterior teste indireto. *Método indireto*, lento, quando se parte de primocultura em meio usual e depois se faz a determinação da sensibilidade nos meios com drogas. É indicado para os escarros com qualquer riqueza bacilar, mas especialmente nos pobres em bacilos ou negativos à microscopia.

Esta técnica é descrita no Apêndice Técnico, com as respectivas diluições. O técnico não deve ficar prêso aos esquemas e exemplos aqui citados, pois com a prática, pode ir observando e ajustando as diluições mais indicadas para obtenção de um número contável de colônias nos tubos de meio sem droga (menos de 100 colônias nos tubos testemunhos).

*Meio de cultura* — É usado o meio de Lowenstein-Jensen com antibióticos incorporados antes da coagulação, que deverá ser feita durante 45 a 50 minutos. Devem ser usados tubos da mesma partida de meio semeados com um dado material patológico.

Com o esquema simplificado, utiliza-se uma concentração intermediária de cada droga, enquanto que alguns laboratórios costumam usar até 3 concentrações. Há detalhes técnicos no preparo destas diluições que não cabem em publicações desta natureza.

O quadro anexo nos dá as concentrações de cada droga nos meios de cultura e também as proporções críticas para interpretação dos resultados.

| Drogas | Abreviações | Concentrações mcg/ml | Percentuais para resistência. Níveis acima de: |
|---|---|---|---|
| Estreptomicina | SM | 4 | 10 |
| Isoniazida | INH | 0,2 | 1 |
| Ac. paraminosalicílico | PAS | 0,5 | 1 |
| Cicloserina | CS | 20 | 50 |
| Etionamida | ETH | 20 | 10 |
| Kanamicina | KM | 20 | 10 |
| Pirazinamida | PZ | 25 | 50 |
| Etambutol | EMB | 2 | 10 |
| Viomicina | VM | 30 | 10 |
| Tiosemicarbazona | TB1 | 2 | 10 |
| Capreomicina | CM | 20 | 10 |
| Rifampicina | RMP | 40 | 1 |

## VI — *Identificação das culturas*

As culturas obtidas, quer sejam por culturas simples ou por testes de sensibilidade às drogas, devem ser identificadas sob pena de se incorrer em êrro, pois há várias espécies de micobactérias passíveis de serem isoladas do homem e que apresentam morfologia bacilar e colonial bastante semelhantes ao bacilo da tuberculose. Tôdas têm em comum o caráter fundamental dos bacilos do gênero *Mycobacterium* — a álcool-ácido-resistência. Os caracteres morfológicos são de pouca utilidade na classificação das espécies de micobactérias. Há certas espécies que apresentam predominância de formas curtas ou cocóides, de formas alongadas ou filamentosas, ou ainda de franco pleomorfismo. É certo que a morfologia dos bacilos varia com o meio de cultura, com a idade e variantes. Certas espécies, como o *M. bovis* ou bacilo bovino, são também patogênicas para o homem. As outras, em sua maioria saprófitas, não são senão ocasionalmente patogênicas; são as chamadas micobactérias "atípicas". Sabe-se que tais bacilos têm larga distribuição pela natureza e podem ser isolados da terra, vegetais, laticínios, das secreções e do corpo dos animais. Importante, por conseguinte, é não confundí-los com o bacilo da tuberculose. Uma descrição de tôdas as micobactérias não seria possível aqui. Assim, limitaremo-nos ao estudo das micobactérias que o bacteriologista clínico possa encontrar e identificar.

| Micobactérias tuberculosas | Micobactérias não tuberculosas, chamadas "atípicas". | |
|---|---|---|
| Responsáveis pela tuberculose do homem: | Responsáveis por afecções viscerais ou ganglionares: | Podem ser responsáveis por ulcerações cutâneas: |
| *M. tuberculosis* | *M. kansasii* | *M. marinum* (ou *balnei*) |
| *M. bovis* | *M. scrofulaceum* | *M. ulcerans* |
| | *M. xenopi* | |
| | *M. avium* | Pràticamente nunca patogênicas |
| | *M. intracellulare* | *M. acquae* |
| | *M. fortuitum* | *M. terrae* |

Os bacteriologistas têm à sua disposição grande número de testes que podem ser usados para a separação das espécies e variedades das micobactérias. Impõe-se, portanto, uma seleção, pois êles não são de valor equivalente. Há testes básicos como a álcool-ácido-resistência, crescimento em várias temperaturas, velocidade de crescimento, morfologia e pigmentação das colônias. Outros testes são considerados complementares, como os testes bioquímicos, sensibilidade a drogas e corantes, patogenicidade para animais, testes sorológicos, fágicos, e outros.

A partir de 1953, grande progresso foi observado nos testes enzimáticos, alguns dos quais pela sua simplicidade, rapidez e eficiência, puderam ser indicados como provas válidas para uma identificação rápida do bacilo da tuberculose e sua diferenciação de outras micobactérias do grupo das denominadas "atípicas".

No L.C.T. da Guanabara vimos seguindo um esquema de identificação que se revelou bastante satisfatório em cêrca de 8.000 culturas, sendo 115 "atípicas" e as restantes, do bacilo da tuberculose. Êste esquema está subdividido em três fases: *1.ª fase — Identificação bioquímica rápida* — Tôdas as culturas isoladas no Setor de diagnóstico são submetidas a cinco testes bioquímicos: niacina, catalase à temperatura ambiente, catalase a 68°C, nitrato-redutase e peroxidase. Um arranjo técnico pemite a realização dêstes testes partindo de um único tubo de cultura, que pode ser o da primocultura ou do testemunho dos testes de sensibilidade. Juntamente com as culturas são fornecidos os resultados dos testes de sensibilidade às drogas de 1.ª linha. Êstes testes já nos dão certa orientação, pois as micobactérias "atípicas" geralmente são resistentes a essas drogas, embora, eventualmente, também possam ser isoladas culturas resistentes do bacilo da tuberculose. Uma vez selecionadas as culturas que não se comportam bioquìmicamente como bacilo da tuberculose, são elas submetidas a outros testes para identificação dos grupos de Runyon, o que constitui a 2.ª fase do trabalho. *2.ª fase — Classificação de Runyon* — Na falta de um critério de classificação, Runyon sistematizou as micobactérias não tuberculosas em quatro grandes grupos, apenas para facilitar o seu estudo. Depois de comprovada a álcool-ácido-resistência, a cultura é observada quanto à velocidade de crescimento e a pigmentação das colônias que permitem a caracterização preliminar dos 4 grupos de Runyon.

*Grupo I — Fotocromógenas* — de crescimento lento. Dão colônias pigmentadas, mas a pigmentação aparece após exposição à luz. As culturas são feitas inicialmente ao abrigo da luz, em tubos envolvidos em papel prêto. A principal espécie é o *M. kansasii*, responsável por afecções pulmonares e ganglionares.

*Grupo II — Escotocromógenas* — de crescimento lento. Dão colônias lisas pigmentadas em amarelo ou amarelo-laranja, pigmento êste que aparece mesmo ao abrigo da luz. Êste pigmento torna-se laranja-escuro ou avermelhado após exposição à luz contínua. Nêste grupo: *M. scrofulaceum*, responsável por adenites da infância e *M. acquae*, contaminante banal de laboratório, que pràticamente não é patogênico. Entretanto, alguns casos de doença pulmonar pelo *M. acquae* têm sido observados.

*Grupo III* — de crescimento lento — *Não fotocromógenas* — Dão colônias não pigmentadas, no escuro e que continuam sem pigmento após exposição à luz. Nêste grupo estão: *M. avium* ou bacilo da tuberculose aviária e *M. intracellulare* ou *batteyi*. Estas duas espécies, muito próximas são responsáveis por afecções pulmonares, ganglionares e ósseas. *M. terrae*, é não patógeno muito freqüentemente encontrado. *M. xenopi* ou *xenopodis*, que não obstante ser *Escotocromógena*, tem muitos caracteres dêste grupo. É responsável por afecções pulmonares.

*Grupo IV* — de crescimento rápido — São micobactérias cujo crescimento em temperatura ambiente e a 37°C é muito rápido, pois dão colônias bem desenvolvidas até em quatro dias. Êste grupo é representado principalmente pelo *M. fortuitum*, responsável por abscessos profundos e, por vêzes, afecções ganglionares.

Há micobactérias que são responsáveis por ulcerações cutâneas, cuja característica principal é o fato de não crescerem a 37°C. Êste grupo é representado pelo *M. marinum*, que é fotocromógena de crescimento rápido, saprófita da água e responsável por ulcerações cutâneas superficiais que aparecem após banhos de piscina (*M. balnei*). Outra espécie é o *M. ulcerans, escotocromógena* ou não cromógena, de crescimento lento, responsável por ulcerações profundas, de tendência fagedênica, dos países tropicais.

*3.ª fase — Identificação das espécies* — Para esta fase são usadas técnicas bioquímicas que evidenciam os caracteres próprios

de cada espécie de micobactéria: amidases, arilsulfatase, degradação do "Tween", prova do citrato de ferro amoniacal, sensibilidade ao TCH, e outras. Também a inoculação em animais é usada como prova decisiva para certas espécies; a descrição destas técnicas prolongaria demasiadamente êste trabalho. As culturas que não se comportarem como bacilo da tuberculose típico, pelos seus caracteres bacteriológicos e bioquímicos devem ser enviadas ao Laboratório Central de Tuberculose da Guanabara para serem tipificadas.

## VII — *Correlação clínica*

No caso do bacilo da tuberculose, é bastante o aparecimento de uma colônia para que o diagnóstico bacteriológico esteja assegurado. O mesmo não acontece com as outras micobactérias, que podem ser isoladas e não estarem relacionadas com o quadro clínico do paciente.

As seguintes recomendações são feitas para esclarecimento de um caso clínico de micobacteriose: 1) Afastar a hipótese de tuberculose. 2) A cultura da micobactéria atípica não deve ser muito pobre. É necessário que haja várias colônias na primocultura. 3) Repetir o isolamento pelo menos três vêzes de material colhido em várias fases da doença. 4) No caso do doente ser levado à cirurgia, ou em caso de óbito, reisolar a micobactéria da peça. 5) Finalmente, comprovar com os dados clínicos disponíveis que a micobactéria é a única responsável pelo estado mórbido.

O isolamento da micobactéria "atípica" em indivíduos tuberculosos é totalmente destituído de valor clínico. Portanto, nêstes doentes o exame direto, não serve para controlar a evolução da doença, pois a micobactéria atípica pode ser responsável por uma prolongada positividade, mesmo depois do desaparecimento do bacilo da tuberculose. Geralmente são resistentes às drogas terapêuticas. Se a micobactéria fôr do grupo das patogênicas para o homem, poderá localizar-se nas lesões inicialmente tuberculosas, mantendo o estado mórbido por muito tempo. Nos tuberculosos curados há alguns anos, temos isolado micobactérias atípicas que certamente se instalaram na lesão já cicatrizada. Caso não houvesse identificação bacteriológica, êstes casos seriam considerados como de recaídas de tuberculose com bacterioscopia positiva.

## APÊNDICE TÉCNICO

### 1. *Exame microscópico*

*Preparo de esfregaços* — As lâminas devem ser novas, desengorduradas por imersão em álcool-ácido sulfúrico 1:1.000 e identificadas com diamante. Com alça de platina ou níquel-cromo rígida escolhe-se uma partícula purulenta (opaca) ou hemorrágica, disto dependendo em grande parte o resultado do exame. Espalha-se em camada delgada por movimentos longitudinais e transversais, formando um retângulo que ocupe 2/3 da lâmina, usando-se se necessário mais de uma partícula de escarro. Deixar secar ao ar e fixar passando na chama ràpidamente duas a três vêzes.

*Coloração de Ziehl-Neelsen — 1.º tempo*: Colocar a lâmina sôbre um suporte de metal ou de vidro. Cobrí-la com fucsina de Ziehl filtrada recentemente. Deixar agir 10 minutos, aquecendo brandamente duas a três vêzes até a emissão de vapores, por meio de algodão montado em arame molhado no álcool, evitando-se a fervura e a secagem do corante. Se necessário, colocar mais corante para manter a lâmina coberta. *2.º tempo*: Descoramento — Derramar o corante. Lavar imediatamente com água corrente. Recobrir com álcool clorídrico a 3% durante 3 minutos. Lavar. O descoramento pode também ser feito com ácido sulfúrico 1:4 — 3 minutos, seguido de álcool — 5 minutos. O esfregaço deve ficar incolor ou ligeiramente róseo. *3.º tempo* — Contra-coloração — Corar durante 30 segundos com solução de azul de metileno filtrada recentemente em papel de filtro. Lavar com água corrente, deixar secar e examinar ao microscópio com objetiva de imersão (100 ×) e ocular (10 ×).

*Microscopia* — Colocar uma gôta de óleo de imersão sôbre a preparação, evitando tocar a lâmina com o bastão para evitar o transporte de bacilos para a lâmina seguinte. Êste exame deve ser feito com método pois o resultado deverá ser expresso em número de bacilos por campo, dado importante na escolha da técnica a ser usada nos testes de sensibilidade, quer direta ou indireta. Inicia-se a contagem deslocando-se o "charriot" longitudinalmente para a direita, anotando-se o número de bacilos álcool-ácido-resistentes que se destacam no fundo azulado da preparação. O bacilo da tuberculose aparece como finos bastões vermelhos, retos ou ligeiramente encurvados, às vêzes granu-

losos, isolados, aos pares ou em grupos. Para facilitar a contagem deve-se percorrer o campo sistemàticamente começando da periferia e terminando no centro do campo microscópico. Logo que todos os campos situados na primeira linha da lâmina estejam examinados, desloca-se lateralmente o "charriot" de alguns milímetros e recomeça-se a percorrer a linha da direita para a esquerda. O número de campos a serem examinados varia com a riqueza bacilar. Se há mais de um bacilo por campo é suficiente examinar 20 campos para assegurar uma boa média do número de bacilos por campo. Se há menos de um por campo, examinam-se 100 campos, e estabelece-se a média do número de bacilos em 10 campos. Se a preparação não mostra bacilos, prossegue-se o exame até uns 200 campos antes de concluir pela ausência de bacilos. Declarar no resultado: "Ausência de BAAR em 200 campos". A verificação de um único bacilo em tôda a lâmina deixa dúvida, devendo-se nêstes casos repetir o exame com nôvo material.

**Corantes**

*Fórmula da fucsina de Ziehl*:

| | |
|---|---|
| Fucsina básica ..... | 1 g |
| Álcool absoluto ..... | 10 ml |

Dissolver por agitação e acrescentar:

| | |
|---|---|
| Fenol aquoso ..... | 5,5 g |

Continuar agitando e acrescentar:

| | |
|---|---|
| Água destilada ..... | 100 ml |

Deixar repousar 24 horas e depois filtrar em papel.

O fenol aquoso é preparado dissolvendo-se 1 kg de fenol cristalizado em 100 ml de água destilada. Aquecer em B.M. até dissolver e deixar esfriar.

*Azul de metileno fenicado*:

| | |
|---|---|
| Azul de metileno ..... | 2 g |
| Álcool absoluto ..... | 10 ml |

Dissolver por agitação

| | |
|---|---|
| Juntar fenol aquoso ..... | 2,2 g |

Continuar agitando e juntar água destilada — 100 ml

Deixar repousar 24 horas e filtrar em papel.

*Ácido sulfúrico 1:4*:

Colocar 75 ml de água destilada num recipiente de vidro Pirex.

Juntar muito lentamente 25 ml de ácido sulfúrico p.a.

Como se produz forte desprendimento de calor, recomenda-se colocar o recipiente imerso em água fria.

*Álcool clorídrico*:

| | |
|---|---|
| Ácido clorídrico ..... | 3 ml |
| Álcool absoluto ..... | 100 ml |

Há várias modificações dêste método no que concerne aos tempos de coloração, mas estas devem ser usadas com muito cuidado dada a possibilidade de falsos resultados. A coloração de fundo pode ser feita usando-se em lugar do azul de metileno, ácido pícrico ou verde malaquita. A mais recente modificação é a coloração a frio, usando a fucsina com detergente ("teepol", laurilsulfato ou "Tween 80").

*Microscopia fluorescente* — Em lugar de corar a lâmina pela fucsina é usada a auramina, que é o fluorocromo mais usado. Os bacilos quando iluminados com luz azul, emitem uma luz amarela contra fundo escuro. É necessário intercalar-se um filtro amarelo para deter os raios azuis, deixando passar os raios amarelos. Os bacilos aparecem como pequenos traços brilhantes o que os torna visíveis mesmo com fraco aumento (200 ×) em lugar de grande aumento (1.000 ×) usado na coloração de Ziehl. O campo microscópico examinado é portanto muito maior o que facilita o achado dos bacilos. Cuidado especial deve ser tomado quanto à presença de partículas naturalmente fluorescentes que podem ser encontradas nos materiais patológicos.

*Microscópio* — Aparelho monocular com fonte luminosa à vapor de mercúrio (HBO 74 ou HBO 200) que é completada com um filtro anticalórico e um filtro excitante BG 12 (3-5 mm de espessura). Usa-se ainda um filtro amarelo de barragem (tipo Kodak Wratten n.º 12) colocado na ocular para defender o globo ocular da ação dos raios ultravioleta.

*Coloração* — Esfregaço fino fixado pelo calor. Recobrir a lâmina com solução de auramina fenicada. Deixar 10 minutos. Lavar. Descorar com álcool-ácido durante 4 mi-

nutos. Lavar. Contra-corar com permanganato de potássio durante 30 segundos. Deixar secar e examinar. Esta lâmina pode depois ser corada pelo método de Ziehl-Neelsen, em caso de dúvida, e examinada ao microscópio comum.

*Exame das lâminas* — Usa-se em lugar da objetiva de imersão, a objetiva a sêco (20 ×) com ocular (6 × ou 8 ×), dando um aumento de 120 × a 160 ×. Cada vez que se encontra uma imagem suspeita de ser um bacilo, é suficiente trocar para uma objetiva mais forte (40 ×) para confirmação.

A vantagem dêste método é a sua rapidez. Dado o custo da aparelhagem o seu uso é recomendado em laboratórios que tenham pelo menos 30 a 50 microscopias por dia, ou quando se deseja exercer fiscalização sôbre os técnicos.

**Reativos**

*Auramina fenicada* — Juntar 3 g de ácido fênico puro a 100 ml de água destilada. Aquecer a 40°C e juntar 300 mg de auramina agitando constantemente. Filtrar em papel e conservar em frasco opaco bem fechado.

*Álcool-ácido*:

| | |
|---|---|
| Cloreto de sódio ..... | 20 g |
| Ácido clorídrico ..... | 20 ml |
| Água destilada ..... | 500 ml |
| Álcool a 75° ..... | 1.500 ml |

*Permanganato de potássio* — Solução a 0,1% em água destilada.

2. *Cultura*

A — *Método de Petroff pela soda*

a) *Com centrifugação*:

1) Colocar alguns ml da parte mais purulenta do escarro em recipiente estéril, fechado hermèticamente;

2) Misturar com 2 volumes de soda a 4% (pouco viscoso) ou 4 volumes (muito viscoso);

3) Agitar vigorosamente e colocar na estufa a 37°C — 30 minutos;

4) Centrifugar a 3.000 r.p.m. — 15 a 20 minutos. Decantar o líquido sobrenadante. O tempo total de contato escarro-soda nunca deve ser superior a uma hora;

5) Neutralizar o sedimento com algumas gotas de ácido sulfúrico a 4% em presença de azul de bromotimol como indicador de pH;

6) Semear algumas gotas no meio de cultura com e sem drogas, que é colocado em posição horizontal até secar. Arrolhar com rôlha de cortiça parafinada a quente e manter na estufa a 37°C, fazendo-se leitura semanal.

b) *Sem centrifugação* — Método simplificado para escarros positivos ao exame direto:

1) Colocar 3 a 4 ml de escarro purulento em gral estéril;

2) Juntar igual parte de soda a 6% e 3 gotas de azul de bromotimol;

3) Triturar a mistura durante 1 a 2 minutos;

4) Colocar na estufa a 37°C — 50 minutos, envolvendo o gral em papel estéril;

5) Neutralizar com algumas gotas de ácido sulfúrico a 15%;

6) Semear algumas gotas no meio de cultura com ou sem as drogas.

B — *Processo do ácido sulfúrico* — Para urina, pus de fístula, fragmento de biopsia ou necropsia:

1) Triturar 2 ml do sedimento de urina ou fragmento de tecidos em gral com areia estéril;

2) Colocar 2 ml de ácido sulfúrico a 15%. Homogeneizar;

3) Deixar à temperatura ambiente por 20 minutos;

4) Neutralizar com soda a 3% e semear no meio de Lowenstein-Jensen.

C — *Método de Darzins* — Agitação-Precipitação [5]:

1) O material patológico (1 ml, quando purulento; 2-3 ml quando fluído) é colocado em tubos de centrifugação, estéreis, com capacidade de 15 ml, fundo redondo, com 10 pérolas de vidro.

2) Juntar 5 ml da solução purificadora:

| | |
|---|---|
| Soda ..... | 1,0 g |
| Fosfato trissódico ..... | 1,0 g |
| Água destilada ..... | 100 ml |

3) Fechar os tubos com rôlha de borracha fervida e colocá-los no agitador de Kahn, durante 5 minutos.

4) Colocar 1 ml da solução precipitadora:

| | |
|---|---|
| Cloreto de cálcio ..... | 0,5 g |
| Água destilada ..... | 100 ml |

5) Agitar manualmente. Aparece um precipitado gelatinoso. Esperar um minuto.

6) Centrifugar 5 minutos a 2.000 r.p.m.

7) Rejeitar o sobrenadante, cuidando para que as pérolas fiquem no tubo.

8) Dissolver o precipitado com 0,3 ml da seguinte solução solvente:

| | |
|---|---|
| Ácido cítrico ..... | 3,0 g |
| Citrato de amônia ..... | 2,5 g |
| Citrato de sódio ..... | 2,0 g |
| Água destilada ..... | 100 ml |

9) Semear algumas gotas no meio de Lowenstein-Jensen e proceder da mesma maneira como para os outros métodos.

D — *Método do laurilsulfato de sódio* (TACQUET & TISON)

**Soluções:**

Solução n.º 1, para descontaminação:

| | |
|---|---|
| Laurilsulfato de sódio puro, em pó | 30 g |
| Soda pura em pastilhas ..... | 10 g |
| Água destilada q.s.p. ..... | 1000 ml |

Dissolver à quente o laurilsulfato e depois juntar a soda.

Conservar à 37°C.

Solução n.º 2, para lavagem e neutralização:

| | |
|---|---|
| Ácido fosfórico puro ..... | 1,5 g |
| Púrpura de bromocresol a 1/250 | 2,0 ml |
| Água destilada ..... | 1000 ml |

A solução é esterilizada em autoclave por 30 minutos a 120°C.

O papel do laurilsulfato é fluidificar o escarro e sensibilizar os bacilos contaminantes à ação tóxica da soda.

*Técnica* — 2 ml de escarro são misturados a 3 ml de laurilsulfato alcalino. A mistura é agitada em agitador de Kahn durante 30 minutos à temperatura ambiente. Neutralizar por adição, até a viragem ao amarelo, da solução ácida n.º 2. Depois, centrifuga-se a 3.000 r.p.m. durante 30 minutos. Decanta-se cuidadosamente e o sedimento é semeado em sua totalidade em vários tubos de meio de Lowenstein-Jensen. A vantagem desta técnica é produzir excelente homogeneização do escarro o que permite boa eliminação dos contaminantes com um menor número de tubos e concentrar por centrifugação o produto patológico produzindo um sedimento pequeno, fácil de ser todo êle semeado. O inconveniente é a necessidade de mais material e as manipulações mais complexas que a técnica da soda.

E — *Processo do "swab" laringeano,* indicado para pessoas que não expectoram.

1) Mergulhar inteiramente o "swab" em solução de ácido sulfúrico a 4%;

2) Depois de 10 minutos, neutralizar com soda a 6% em presença de indicador de pH. Gasta cêrca de 3,5 ml;

3) Esfregar o "swab" na superfície do meio de L.J. ou agitá-lo no meio de Sula.

3. *Testes de sensibilidade a drogas*

*Teste direto* — com o próprio material patológico:

1) Fazer o esfregaço, corar e determinar o número de bacilos por campo como foi indicado na parte de microscopia;

2) Tratar o escarro por um dos métodos de descontaminação indicados anteriormente, com ou sem centrifugação;

3) Consultar as tabelas para a escolha das diluições a serem semeadas. Na primeira parte dêste trabalho encontram-se uma tabela aplicada no L.C.T. para o método de Darzins, com centrifugação. A seguir, apresentamos a tabela recomendada por Canetti para o método da soda, sem centrifugação:

| n.º de bacilos ao microscópio com objetiva de imersão | Diluições a semear | |
|---|---|---|
| | Tubos testemunhos | Tubos c/ drogas |
| Menos de 1 bacilo por campo | Sem diluição (1) | Sem diluição (1) |
| De 1 a 10 bacilos por campo | 1, 1:100 e 1:1000 | 1 e 1:1000 |
| Mais de 10 bacilos por campo | 1:10 e 1:1000 | 1:10 e 1:10000 |

4) Semear 0,2 ml de escarro nos tubos testemunhos (2) e com as drogas escolhidas. Geralmente o teste direto é usado para drogas de 1.ª linha. A semeadura de uma diluição suplementar (1:1.000) nos tubos testemunhos é recomendada porque o número de colônias obtido com a diluição anterior às vêzes é difícil de contar;

5) Ver a leitura dos resultados quando fôr descrito o teste indireto.

*Teste indireto* — É feito a partir da primocultura em meio de L.J.:

1) Colhêr com espátula de platina ou de vidro partículas do maior número possível de colônias da primocultura e colocar em frasco Erlenmeyer estéril com pérolas de vidro e 0,5 ml de água destilada;

2) Agitar durante 30 segundos e colocar 5 ml de água destilada lentamente, com o balão em agitação;

3) Colocar a suspensão em tubo de 22 mm de diâmetro e ajustar a opacidade com água destilada ao padrão de 1 mg/ml de bacilos (BCG) ou o tubo n.º 1 da Escala de Mac Farland;

4) Preparar as seguintes diluições partindo da suspensão de 1 mg/ml: 0,1 mg/ml — 1 ml da suspensão mãe e 9 ml de água destilada (I)
0,01 mg/ml — 1 ml da suspensão I e 9 ml de água destilada (II) e assim por diante até 0,00001 mg/ml. Agitar as diluições e trocar a pipeta para cada diluição;

5) Semear 0,2 ml nas séries de tubos de acôrdo com o seguinte esquema: O número esperado de colônias é o seguinte:

Bateria A: 1:1000-10000 colônias (incontável)
Bateria B: 1:100000-100 colônias
Bateria C: 1:1000000-10 colônias;

6) Após a semeadura, quer no teste direto ou indireto, os tubos são colocados horizontalmente de modo que o inóculo fique banhando a superfície do meio. Deixar evaporar e arrolhar com rôlha de borracha ou de cortiça prèviamente mergulhada em parafina quente. Os tubos são recolocados na estufa até a leitura final;

7) O técnico não deve ficar prêso aos esquemas e exemplos aqui citados, pois com a prática, pode ir observando e ajustando as diluições mais indicadas para obtenção de números determináveis de colônias nos tubos-contrôle (menos de 100 colônias).

*Leitura dos resultados*

*1.ª leitura* — com 28 dias. A não ser que sem drogas se trate de linhagem disgônica, já teremos o crescimento final nos meios normais. Podem ser feitas as contagens das colônias, calculadas as proporções e concluir-se pela resistência ou não, de acôrdo com a proporção crítica estabelecida para cada droga, conforme tabela apresentada anteriormente.

*2.ª leitura* — com 42 dias. Quando se observa crescimento disgônico nos tubos testemunhos, ou quando apenas se observa início de crescimento nos tubos com drogas.

No L.C.T. os resultados são anotados da seguinte maneira:

| | |
|---|---|
| + + + + | crescimento confluente |
| + + + | colônias em número incontável |
| + + | 1/4 da superfície do meio está recoberta de colônias |
| + | mais de 100 colônias |
| × | número de colônias abaixo de 100. |

O seguinte exemplo nos dá idéia do que acima foi dito, para um exame de escarro com + + + à microscopia, com o qual foi feito teste direto:

| Bateria | Diluição | Testemunhos | | SM-4 mcg/ml | INH-0,2 mcg/ml | PAS-0,5 mcg/ml |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | S.D. | +++ | +++ | +++ | + | 100 |
| B | 1/1000 | 110 | 90 | 100 | 2 | 0 |
| Resultado | | | | 100% | 2% | 0,1% |
| Proporção crítica | | | | 10% | 1% | 1% |
| Interpretação | | | | Resistente | Resistente | Sensível |

Cálculo da proporção de bacilos resistentes contidos na amostra usada no exemplo da tabela anexa.

O número total de bacilos viáveis contidos em 0,2 ml da diluição 1:1000 (que foi o inóculo empregado) é indicado pelo número de colônias encontradas em cada tubo-testemunho semeado com esta diluição. Tomando a média dos dois tubos, acha-se que êste número é $\frac{110 + 90}{2}$ 100 colônias. Assim, cada tubo-testemunho semeado com a diluição 1:1000 recebeu 100 bacilos viáveis. Os tubos com SM também receberam êste inóculo. Dos 100 bacilos viáveis que o tubo com SM também recebeu, quantos deram colônias? Isto é, quantos bacilos se mostraram resistentes à SM? Todos, ou seja, 100% dos bacilos da amostra se mostraram resistentes a 4 mcg/ml de SM. Para a INH, o raciocínio é o mesmo e temos 2% de bacilos resistentes e para o PAS, apenas 0,1%, considerado sensível, pois é inferior a 1% que é a proporção crítica para esta droga.

Cálculo idêntico é feito para os testes indiretos, nos quais é sempre incluída a Bateria C, sòmente para os testemunhos, com uma diluição 10 vêzes menor do que a da Bateria B, a fim de facilitar a contagem das colônias e o cálculo da proporção de resistentes.

Para testar as novas partidas de meio de cultura é recomendado incluir-se entre as culturas uma amostra H37RV sensível às drogas ensaiadas.

*Testes com drogas de 2.ª linha e drogas recentes* — Em linhas gerais os testes com outras drogas são feitos da mesma maneira, sempre utilizando-se o teste indireto. Variam apenas as concentrações das drogas e as proporções críticas para avaliação dos percentuais de resistência.

4. *Identificação das culturas* (1)

*Identificação bioquímica rápida* — Do ponto de vista prático, interessa saber ràpidamente se uma cultura isolada é ou não de bacilo da tuberculose. O esquema descrito a seguir está em uso no L.C.T. há 3 anos, e portanto, aprovado na prática.

1) Usam-se as primoculturas ou os tubos testemunhos dos testes de sensibilidade desde que apresentem crescimento abudante. As culturas com raras colônias poderão falhar em alguns testes. Nêstes casos repicar e repetir os testes com crescimento de 30 dias;

2) Seqüência das operações para os testes: niacina, catalase à temperatura ambiente, termo-inativação da catalase, peroxidase e nitrato-redutase:

a) colocar 2 ml de tampão de fosfatos (pH 7.0) com 0,1% de nitrato de sódio no tubo ou frasco de cultura original, de modo que o tampão fique banhando a cultura; b) incubar em estufa ou banho-maria durante 2 horas a 37°C; c) fazer o teste da *niacina* em placa de porcelana escavada, usando-se algumas gotas do tampão sobrenadante; d) com bastão de vidro, suspender e triturar o crescimento; e) com pipeta Pasteur, colocar 10 gotas em cada um de 2 tubos de hemólise (1.ª série e 2.ª série); f) colocar uma das séries de tubos de hemólise em banho-maria a 68°C por 30 minutos; g) retirar os tubos do banho-maria, resfriar, colocar 0,5 ml de água oxigenada com "Tween 80" em cada um dos tubos da 1.ª e 2.ª séries, para verificação da *catalase à temperatura ambiente* e da *termo-inativação* da catalase; h) retornar os tubos ou frascos de cultura com o restante do tampão à estufa a 37°C até completar 4 horas; i) fazer o teste da *nitrato-redutase* no tubo original de cultura; j) o teste da *peroxidase* é feito em outro tubo de cultura, juntando-se uma mistura de catecol com água oxigenada.

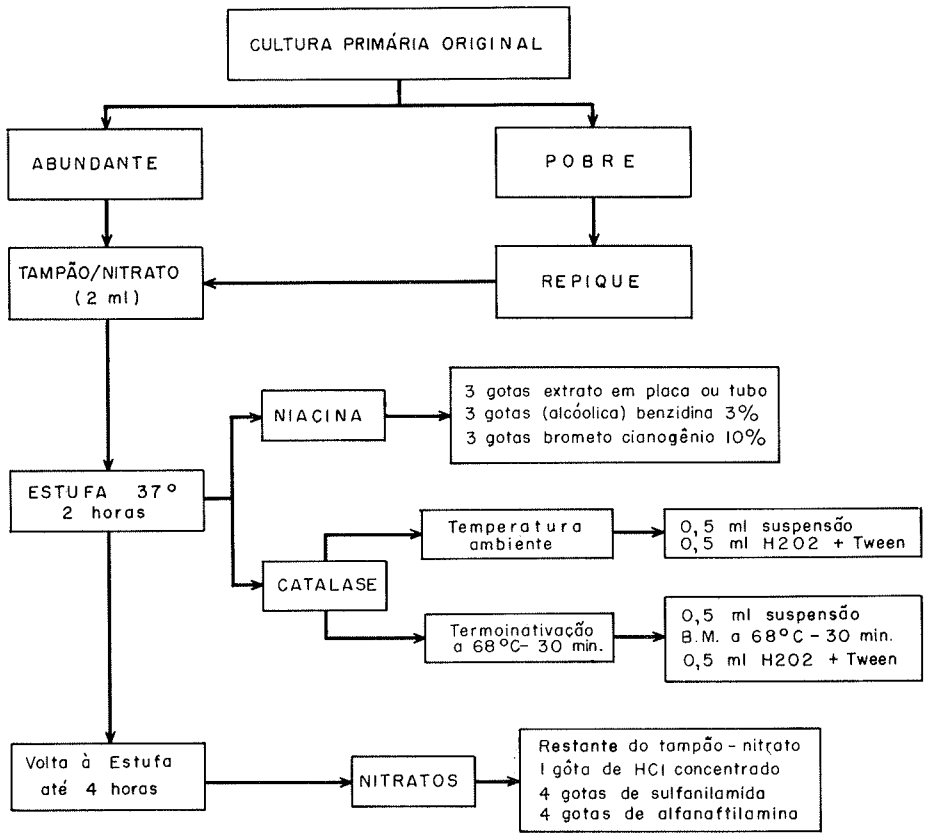
Todos os testes são de leitura imediata e sua positividade permite a identificação do bacilo da tuberculose e o encaminhamento da identificação de outras espécies por métodos bacteriológicos e bioquímicos.

O esquema abaixo nos dá idéia da seqüência das operações.

pode também ser preparada partindo do bromo, do seguinte modo:

Água destilada ou água bromada 4 ml
Bromo ..... 0,2 ml

Cianeto de sódio a 10% — gotejar até o descoramento.




*Niacina* — ou ácido nicotínico é sintetizada pelo bacilo humano em quantidade muito maior do que pelo bacilo bovino e as outras micobactérias. Êste é o teste mais importante, pois sòmente com o bacilo humano dá positivo. Técnica de Konno, com brometo de cianogênio:

*Reativos*: a) solução alcoólica de benzidina a 3%; b) solução aquosa de brometo de cianogênio a 10%.

Êste reativo pode ser preparado diretamente com o brometo de cianogênio, observando-se os seguintes cuidados, dada a sua toxicidade: colocar uma porção do sal em frasco fechado e prèviamente pesado. Pesar novamente o frasco com o sal e diluir na proporção indicada. Manter a solução em frasco escuro em refrigerador. Esta solução

*Técnica*: a) colocar 3 gotas do tampão de fosfatos que esteve banhando a cultura durante 2 horas, em placa escavada ou em tubo de hemólise; b) 2 gotas de solução alcoólica de benzidina a 3%; c) 2 gotas de solução de brometo de cianogênio a 10%.

*Leitura* — 5 minutos após, ler os resultados, quando a intensidade da côr vermelha atinge ao máximo. Pode ser classificada entre + e +++.

*Cuidados* — Êste teste deve ser feito colocando-se a placa de porcelana em capela com exaustão ou trabalhando em sala bem arejada, com ventilador ao lado. Os mesmos cuidados devem ser tomados no momento do preparo do brometo de cianogênio. Logo após haver concluído o teste, colocar algumas gotas de solução de soda ou amônia a

10% na placa para cessar o desprendimento de vapores tóxicos. Ferver por 15 minutos, lavar e secar a placa antes de usá-la novamente.

*Contrôles* — Conferir a atividade dos reagentes cada 15 dias com solução de niacina a 5 mcg/ml, que é o equivalente à niacina produzida pelo bacilo da tuberculose. Incluir também uma cultura sabidamente positiva e outra negativa.

*Catalase e termo-inativação* — A catalase é uma enzima que decompõe a água oxigenada liberando oxigênio, que se traduz pelo desprendimento gasoso. Tôdas as micobactérias possuem esta enzima, embora em intensidade variável de acôrdo com a espécie. O bacilo da tuberculose decompõe a água oxigenada, mas não tão intensamente como as micobactérias atípicas e saprófitas. Há ainda a particularidade de que, quando uma cultura de bacilo da tuberculose se torna resistente à hidrazida, pode perder total ou parcialmente a catalase-atividade

A catalase do bacilo da tuberculose é termolábil e se destroi a 68°C em 30 minutos, enquanto que as demais micobactérias revelam catalase-ativa depois desta prova. Serve para confirmar o teste da niacina na identificação do bacilo humano.

*Técnicas*:

I — Catalase à temperatura ambiente:

| | |
|---|---|
| Suspensão da cultura ..... | 0,5 ml |
| Reativo "Tween-peridrol" ..... | 0,5 ml |

II — Termo-inativação da catalase:

| | |
|---|---|
| Suspensão aquecida a 68°C ..... | 0,5 ml |
| Reativo "Tween-peridrol" ..... | 0,5 ml |

*Leitura* — Verificar o desprendimento de pequenas bôlhas após a adição do reativo. A intensidade da reação pode ser expressa de + a +++ de acôrdo com a altura da coluna gasosa.

*Nitrato-redutase* — Prova baseada na redução do nitrato (NO3) a nitrito (NO2), que é pesquisado após 4 horas de incubação. É positiva para o bacilo humano e negativa para o bacilo bovino. As demais micobactérias apresentam resultados variáveis. O resultado dêste teste vem confirmar o dos testes anteriores e orientar na identificação futura de outras espécies.

*Reativos*: Tampão de fosfatos M/15, pH 7.0, com 0,1% de nitrato de sódio; Ácido clorídrico concentrado; Solução aquosa de sulfanilamida a 0,2%; Solução aquosa de alfa-naftilamina a 0,1%.

*Técnica* — O teste é feito no próprio tubo ou frasco de cultura original: a) pingar uma gôta de ácido clorídrico concentrado sôbre a cultura; b) 4 gotas de solução de sulfanilamida; c) 4 gotas de solução de alfa-naftilamina.

*Leitura* — O aparecimento imediato da côr vermelha é indicativo da reação positiva, cuja intensidade varia do róseo ou vermelho intenso e pode ser expressa de + a +++. Fazer um contrôle sem bactérias e outro com uma cultura sabidamente positiva. Uma contra-prova pode ser feita com zinco em pó: o nitrato não reduzido pela cultura é ràpidamente reduzido pelo zinco e dá uma côr vermelha nos tubos negativos, comprovando a incapacidade do germe em processar a redução.

*Peroxidase* — É uma enzima que catalisa oxidações a partir da água oxigenada, que se traduz por enegrecimento das colônias quando elas são colocadas em presença da água oxigenada e de um substrato oxidável (catecol ou benzidina). Tem significado semelhante à catalase quanto às culturas sensíveis e resistentes à hidrazida. Entretanto, ela se torna negativa mais precocemente e em níveis mais baixos de resistência. Quanto às micobactérias atípicas, ao contrário da catalase, apresentam-se peroxidase-negativas.

*Reativo*:

| | | |
|---|---|---|
| Pirocatequina ..... | 0,1 | g |
| Água oxigenada 110 col. ..... | 0,5 | ml |
| Água destilada ..... | 100 | ml |
| "Tween 80" ..... | 1,25 | ml |

A solução conserva-se duas semanas no refrigerador.

*Técnica* — Banhar a cultura em tubos ou placas com o reativo acima e deixar uma hora à temperatura ambiente. Observar a modificação na coloração das colônias:

Colônias escuras ou negras — peroxidase-positivas;
Colônias incolores — peroxidase-negativas.

Depois de 18 a 24 horas, examinar uma segunda vez, pois certas amostras dão reações tardias.

| Micobactérias | Niacina | Catal. T. A. | Catal. 68º | Nitratos | Peroxidase |
|---|---|---|---|---|---|
| Bacilo humano INH-S | + | + | 0 | + | + |
| Bacilo humano INH-R | + | 0 | 0 | + | 0 |
| Bacilo bovino | 0 | + | 0 | 0 | + |
| Micobactéria atípica | 0 | + | + | +/0 | 0 |

Concluída esta fase da identificação, temos um grupo de culturas identificadas como bacilo humano, o que constitui a maioria em um serviço de rotina de tisiologia que recebe materiais de hospitais e dispensários. Também o *M. bovis* ou bacilo tuberculoso bovino, cujo poder patogênico para o homem é também considerável, pode ser isolado. A estas duas espécies é preciso acrescentar a amostra BCG, bacilo bovino atenuado, que pode ser isolado de adenopatias e de abscessos pós-vacinais. Finalmente, temos um pequeno número de culturas que se comportam como micobactérias atípicas e que devem ser tipificadas.

*Grupamentos de Runyon*

Na falta de um critério de classificação, Runyon sistematizou as micobactérias atípicas em 4 grandes grupos, apenas para facilitar o seu estudo. Depois de comprovada a álcool-ácido-resistência, a cultura é observada quanto à velocidade de crescimento e à pigmentação das colônias que permitem a caracterização preliminar dos 4 grupos de Runyon, já descritos anteriormente.

*Velocidade de crescimento* — Permite dividir as micobactérias atípicas em dois grandes grupos: as de crescimento lento e as de crescimento rápido. Se o aparecimento das colônias ocorre, em menos de duas semanas é provável que se trate de amostra atípica ou saprófita. Entre as que crescem depois de duas semanas está o bacilo da tuberculose, embora também possam surgir micobactérias atípicas, que nos repiques sucessivos passariam a crescer mais ràpidamente. As de crescimento lento, isto é, de mais de uma semana, pertencem aos grupos I, II e III e as de crescimento rápido pertencem ao grupo IV.

*Cromogenicidade* — A produção de pigmento nas micobactérias é um dado importante para sua sistemática. Umas sintetizam o pigmento no escuro, outras exigem exposição à radiação de espectro visível para a fotossíntese dos carotenóides e um terceiro grupo nunca produz pigmento. A prova é feita semeando-se dois tubos de cada amostra, os quais são colocados em caixa à prova de luz, a 37°C até crescimento abundante. *Para as de crescimento rápido*: 7 dias. *Para as de crescimento lento*: 2 a 4 semanas. Também pode-se proteger a terça parte de baixo do tubo com uma tira de papel grosso gomado de cêrca de 2 cm de largura ou envolver o restante do tubo em papel prêto.

*Fotocromogenicidade* — Para a prova rápida, retirar um dos tubos da caixa e expô-lo à luz solar ou artificial (lâmpada de 30 a 100 W) à distância de 45 cm por uma hora e depois recolocá-la na caixa. Na manhã seguinte ou após 24 horas a formação do pigmento é observada. Na parte iluminada as amostras fotocromogênicas mostram um pigmento amarelo claro ou laranja, ao passo que as colônias que tenham sido ocultas pela tira de papel mantiveram a côr normal. A prova lenta é feita expondo-se um dos tubos cultivados no escuro, à luz difusa ambiente e observando-se o aparecimento do pigmento ou sua intensificação e comparando-o com o tubo que ficou no escuro ou envolvido em papel prêto, por período de dois dias até duas semanas. As rôlhas de borracha ou de cortiça devem ser retiradas durante esta prova.

SUMMARY

*Laboratory diagnosis of tuberculosis*

The methods used in the diagnosis of human tuberculosis and other mycobacteria infections are reviewed. Methods of collection, preservation and transportation of specimens, microscopical examination, growth and identification of mycobacteria, determination of their sensitivity to drugs and the interpretation of the bacteriological findings, are discussed. This review includes an appendix where the most important techniques are thoroughly described.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, L. — Identificação bioquímica rápida do bacilo da tuberculose em cultura primária. *Rev. S.N.T.*, **46**:125, 1968.

2. CANETTI, G.; RIST, N. & GROSSET, J. — Mesure de la sensibilité du bacille tuberculeux aux drogues antibacillaires par la méthode des proportions. Méthodologie, critères de résistance, résultats, interprétation. *Rev. Tuberculose Pneumologie,* **27**:217, 1963.

3. CANETTI, G. & GROSSET, J. — *Technique et Indications des Examens Bacteriologiques en Tuberculose.* Paris, Editions de la Tourelle, 1968.

4. DARZINS, E. — Diagnóstico bacteriológico da tuberculose (Experiência de 2 anos com o método Agitação-Precipitação). *Arq. IBIT,* **11**:106, 1952.

5. DARZINS, E. — *The Bacteriology of Tuberculosis.* Minneapolis, University of Minnesota Press, 1958.

---

Recebido para publicação em 14/4/1970.

## *Eficácia e Segurança!*

***o que o médico deseja para o tratamento de seus pacientes com infecções bacterianas:***

# VERSATREX

(betacilina Bristol)

**Modo de Usar:**

**Crianças com menos de 40 quilos: - Dose média de 25 a 50mg por quilo de pêso ao dia, dividida em 4 tomadas. Doses maiores serão necessárias de acôrdo com a infecção.**

**Adultos (e crianças com mais de 40 quilos): - Dose média: 250 a 500mg cada 6 horas.**

**Apresentações:**

**Cápsulas de 250mg e de 500mg: - caixas com 8 e 48 cápsulas.**

**Injetável com 250mg, 500mg e 1g - frasco ampola com diluente.**

**Pediátrico: Pó para 30 e 60cm³ de suspensão com 125mg por 5cm³.**

BRISTOL LABORTERAPICA-BRISTOL S.A.
Ind. Quím. e Farm. - R. Carlos Gomes, 924 (Sto. Amaro) - S.P.

ciam publicidade

# OXOID

**AGAR BACTERIOLÓGICO N.° 1**

— òticamente claro
— livre de opalescência
— não precipita
— não flocula

excepcional rendimento
— 9 g p/litro

**MEIOS DE CULTURA DE ALTA QUALIDADE**

**MULTODISCOS PARA ANTIBIOGRAMAS**

— seleção racional dos agentes

— práticos e econômicos

**GRANDE VARIEDADE PARA PRONTA ENTREGA**

**PREÇOS CONVENIENTES**

**D. S. T. AGAR BASE**

— seguramente o mais indicado para antibiogramas

— não impede a difusão de antibióticos, sulfonamidas e antissépticos urinários.

**SOLICITEM-NOS LITERATURA CONSULTEM-NOS SEMPRE**

**C. L. E. D. MEDIUM**

novidade em bacteriologia urinária

fácil identificação de 10 germes patogênicos

**Distribuidora exclusiva:**

CELM

**Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos**

**Av. 9 de julho, 1217 — fones: 256-1682/256-9848**

SÃO PAULO — SP

**BREVE MUDAREMOS: Rua Barata Ribeiro, 369**


Edanee - Imprimiu