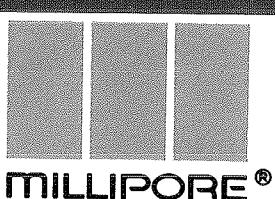


Volume 10 Número 3 Julh.-Set. 1979

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil

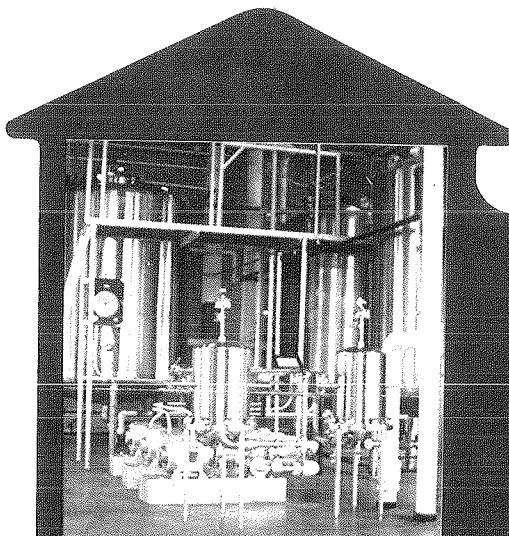




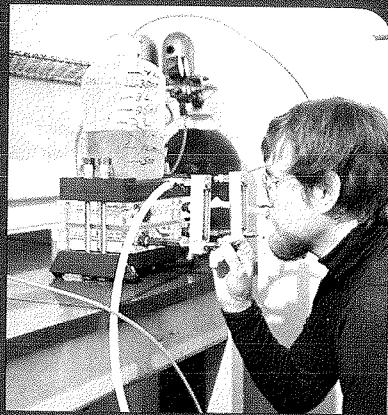
SE VOCÊ TEM PROBLEMAS COM:

- Rejeição por partículas
- Pirogênio - remoção e análise
- Esterilização e clarificação
- Água para injetáveis
- Análises bacteriológicas
- Ensaio de esterilidade
- Água ultrapura para laboratórios
(Excedendo padrões ASTM, USP, CAP)
- Concentração, separação e diálise
de macromoléculas

NÓS TEMOS A SOLUÇÃO,
APLICANDO NOSSA TECNOLOGIA,
ATRAVÉS DE TÉCNICOS DE NÍVEL
SUPERIOR, ESPECIALMENTE
TREINADOS.



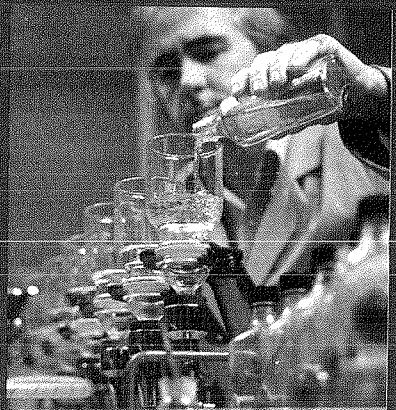
Sistema de filtração
em produção farmacêutica



Sistema Cassete de ultrafiltração



Sistema Milli-Q para purificação
de água



Sistema para análise bacteriológica
e de esterilidade

Millipore Ind. e Com. Ltda. - Subsidiária da Millipore Corporation
Rua Guilherme Bannitz, 147 - CEP 04532 - São Paulo - Cx. Postal 19065
Tel. 531-4439 - Telex 1125078 Mily BR.



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia São Paulo — Brasil

Conselho Diretor Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Diretor Executivo João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Diretores Associados Flávio Alterthum
Instituto de Química — USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Assistente de Diretoria Leila Vasconcellos
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 400,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 100,00 para o Brasil e US\$ 7.00 (via aérea) ou US\$ 6.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Single copies: US\$ 7.00 (air mail) or US\$ 6.00 (surface mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

| | | |
|------------------|---|--|
| Diretoria | Presidente Wilson Chagas de Araujo Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências Médicas Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ | Secretário Geral Nelson Jeronymo Lourenço Faculdade de Ciências Médicas UERJ Departamento de Micro e Imunologia R. Teodoro da Silva, 48 20000 Rio de Janeiro RJ |
| | Vice-Presidente João Salvador Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP | Tesoureiro Milton Mangini 01000 São Paulo SP |

Objetivos A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, anualmente, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho diretor.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Diretor Executivo da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Diretores da Revista.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (*Genetics*, 54:61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.*, 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (*Enzyme Nomenclature*, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milímicro (mμ) e micromico (μμ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10⁻⁶m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10⁻⁹m), ao invés de milímicro (mμ); e Angstroms (A; 10⁻¹⁰m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros (μg/ml) ou microlitros por litro (μ litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7^a ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A página-título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O resumo não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes, de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas e minúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

Weiser, O. L. & Emerson, J. S. — Selective screening for quantitative urine cultures.
Amer. J. clin. Path., 45:649-650, 1966.

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: Publ. Hlth Rep. (Wash.).

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:

Miller, S. E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retículas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente 50 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Diretor Executivo, correndo as despesas por conta dos interessados.

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 10 Julho-Setembro 1979 Número 3

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 10 (3)

CONTEÚDO

CONTENTS

| | | | |
|---|-----|---|--|
| Luiz R. Trabulsi | 85 | Níveis séricos da bacampicilina em voluntários saudáveis | Bacampicillin plasma levels healthy volunteers |
| Allen N. Hagler & L.C. Mendonça-Hagler | 88 | Exigências vitamínicas de leveduras de estuário marinho poluído no Rio de Janeiro | Vitamin requirements of yeasts isolated from polluted seawater of Rio de Janeiro |
| N. Kaufmann Robbs & P. Guimarães Robbs | 92 | Condições microbiológicas de produtos cárneos comercializados no Rio de Janeiro | Microbiological condition of meat products in Rio de Janeiro market |
| José Ximenes Wilson Fry Claudio K. Hirai & Igor Mimica | 97 | Comparação a resistência a drogas de organismos Gram-negativos aeróbios isolados nos E.U.A. e no Brasil | Comparison between the resistance to drugs shown by Gram-negative aerobic organisms isolated in Brasil and in the United States |
| S. R. de Andrade Leite Hidetake Imaasato & Paulo Anna Bobbio | 100 | Inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> S6 por uma melanoidina obtida da reação entre glicose e glicina | Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> S6 growth by a melanoidin obtained from a reaction between glucose and glycine |
| M.R. Fernandes de Toledo M. H. Lemos dos Reis Jayme Murahovschi Roberto Cury S.R.T. da Silva Ramos Eraldo Samogin Fiore Eric Yehuda Schussel & Luiz Rachid Trabulsi | 103 | Ocorrência de uma variante de <i>Salmonella typhimurium</i> que fermenta a lactose tardivamente | Occurrence of a <i>Salmonella typhimurium</i> variant, which ferments lactose slowly, in São Paulo, Brazil |
| C.F. Tachibana Yoshida Ana Maria C. Gaspar K.B. Feldman Marzochi & Hermann G. Schatzmayr | 106 | Antígeno HBs, subtipos e anticorpo anti-HBs em populações brancas e asiáticas de comunidades urbana e rural | HBsAg, subtypes and HBsAb in white and Asiatic populations from urban and rural communities in the south of Brazil |
| João R.C. Andrade & Y.C.M. Macedo Soares | 111 | Emprego do método de coaglutinação para identificação presuntiva de <i>Vibrio cholerae</i> | Coagglutination method for identification of <i>Vibrio cholerae</i> |
| Rosana E. Gregori Claudio C. Lombardi Eloisa F. Ferreira Luiz C. Raphaelli & Susan Berthold | 121 | Estudo da população bacteriana de amostras de lodo colhidas no digestor da Estação de Tratamento de Esgotos de Pinheiros (SABESP) — Contagem de bactérias anaeróbias e facultativas do lodo em digestão anaeróbia | Study of bacterial population in sludge samples obtained from the Sewage Treatment Plant of Pinheiros, (SABESP). Counting of anaerobic and facultative bacteria in anaerobic digesters |

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Interlabor — Importação e Exportação de Artigos para Laboratórios Ltda.

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.

Níveis séricos da bacampicilina em voluntários saudáveis

Luiz R. Trabulsi*

Resumo

Foram determinados os níveis séricos da bacampicilina (pró-droga da ampicilina) em 12 voluntários adultos normais. O antibiótico foi dosado pelo método da difusão em agar usando-se a *Sarcina lutea* ATCC 9341 como organismo teste. Os níveis séricos médios encontrados foram de 4.87, 13.51, 11.59, 7.08, 1.29, 0.36 e 0.08 µg/ml respectivamente 1/2, 1, 1 1/2, 2, 4, 6 e 8 horas depois da administração oral de 800mg do antibiótico. Os níveis séricos bastante elevados e superiores aos encontrados com doses equimolares de ampicilina e outras aminopenicilinas atestam o importante progresso que a bacampicilina representa como pró-droga da ampicilina. Salienta-se a importância do estudo farmacocinético como procedimento de rotina na avaliação de novos fármacos no campo da antibioticoterapia.

Summary

Bacampicillin plasma levels healthy volunteers

Bacampicillin (pro-drug of ampicillin) serum levels were determined in 12 adults healthy volunteers. The antibiotic was dosed by diffusion in agar using the *Sarcina lutea* ATCC 9341 as test organism. The mean serum levels found were: 4.87, 13.551, 11.59, 7.08, 1.29, 0.36 and 0.08 g/ml respectively 1/2, 1, 1 1/2, 2, 4, 6 and 8 hours after oral administration of 800mg of bacampicillin. The serum levels observed were higher and superiors than the results observed with equimolar doses of ampicillin and others aminopenicillins and emphasize the important progress that Bacampicillin represents as an ampicillin's pro-drug. It is important to point out the pharmacokinetic study as a routine proceeding in the evaluation of new drugs in the antibiotics field.

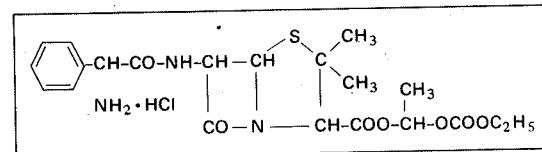
A bacampicilina é um éster da ampicilina para administração oral; quimicamente é o penicilinato de 1'-etoxicarboniloxietil 6-D- α -aminofenilacetamido, na forma de cloridrato (Fig. 1). O radical químico lateral, ligado ao núcleo do ácido 6-aminopenicilânico, confere à bacampicilina características especiais; substâncias deste tipo atualmente são classificadas como pró-drogas, ou seja, liberam a droga ao nível intestinal, sendo então absorvidas e fornecendo, no plasma, a substância ativa (5, 6).

No caso da bacampicilina, o radical vetor é um éster complexo, lipossolúvel que permite maior absorção ao nível da membrana celular

(14). Sua absorção, além de rápida, é da ordem de 95 a 98% conforme, Bodin & col. (1), Sjövall & col. (13), Bergan & col. (2), Simon (10), Simon & col. (11, 12).

O fato de ser rapidamente e quase que totalmente absorvida, confere à bacampicilina algu-

Figura 1 — Estrutura química do cloridrato de bacampicilina (pró-droga da ampicilina)



*Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina. Rua Botucatu, 862 - 3º andar, 04023 São Paulo SP.

mas características terapêuticas importantes: níveis séricos precoces e elevados (5, 6, 8, 9, 13), pouca variação individual, com relação à absorção (13), que também não é influenciada pelas refeições (8), extensa penetração tissular (3, 4, 6, 7, 11, 12) e pouco contato com a flora intestinal, devido à maior absorção e eliminação na forma de pró-droga, esta do ponto de vista antibacteriano, inativa (10, 14).

Os níveis sanguíneos da bacampicilina foram objeto de estudos prévios (8, 15) e comparativos com a ampicilina e amoxicilina (2, 5, 6, 13).

No presente estudo farmacocinético, foram verificados os níveis séricos da bacampicilina, administrada por via oral, em voluntários saudáveis, em nosso meio.

Material e Métodos

Os níveis séricos de bacampicilina foram investigados após administração oral, de uma única dose de 800mg da droga (2 comprimidos de 400mg). Foram estudados 12 voluntários normais (saudáveis), de ambos os sexos, cuja idade variou entre 17 e 42 anos.

O estado de normalidade foi estabelecido após exame clínico completo e pelos resultados dos seguintes exames: abreugrâfia, hemograma, urina tipo I, parasitológico de fezes, dosagem de glicemia de jejum, transaminases, uréia e creatinina. Cada voluntário recebeu 800mg de bacampicilina por via oral, em torno das 8 horas da manhã, todos permanecendo em regime alimentar normal (dieta padronizada).

Antes da administração do antibiótico e depois de 1/2, 1, 1 1/2, 2, 4, 6 e 8 horas, foram colhidos aproximadamente 8ml de sangue venoso, de cada voluntário.

Tabela 1 — Níveis séricos da bacampicilina em 12 voluntários saudáveis

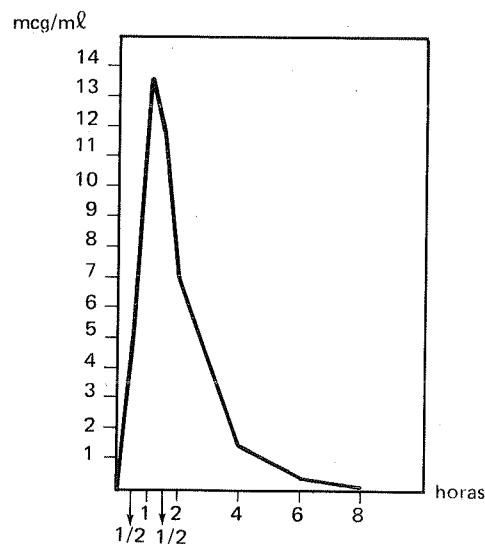
| Volunt. ↓ | Hora ↓ | 0h | .1/2h | 1h | 1 1/2h | 2h | 4h | 6h | 8h |
|--------------|-----------|-------|-------|-------|--------|------|------|------|----|
| 1 | ND | 11.82 | 14.76 | 11.01 | 7.00 | 1.36 | 0.49 | 0.14 | |
| 2 | ND | 5.35 | 7.94 | 9.90 | 5.72 | 0.77 | 0.19 | ND | |
| 3 | ND | 2.62 | 9.30 | 9.20 | 7.75 | 1.84 | 0.43 | 0.11 | |
| 4 | ND | 5.88 | 9.15 | 7.56 | 4.06 | 0.62 | 0.17 | ND | |
| 5 | ND | 11.48 | 15.95 | 8.56 | 5.94 | 0.84 | 0.18 | ND | |
| 6 | ND | 2.43 | 14.22 | 14.38 | 7.35 | 1.48 | 0.44 | 0.07 | |
| 7 | ND | 1.87 | 18.50 | 16.30 | 8.65 | 1.53 | 0.46 | 0.10 | |
| 8 | ND | 1.20 | 10.86 | 10.03 | 5.85 | 0.82 | 0.21 | ND | |
| 9 | ND | 4.08 | 14.44 | 11.29 | 6.67 | 1.00 | 0.32 | 0.11 | |
| 10 | ND | 2.82 | 16.35 | 18.15 | 9.22 | 1.59 | 0.57 | 0.18 | |
| 11 | ND | 1.49 | 10.75 | 9.30 | 6.77 | 1.11 | 0.29 | 0.08 | |
| 12 | ND | 7.42 | 19.90 | 13.35 | 9.95 | 2.51 | 0.62 | 0.22 | |
| X | ND | 4.87 | 13.51 | 11.59 | 7.08 | 1.29 | 0.36 | 0.08 | |

Depois de coagulado o sangue, o soro obtido foi congelado a 20°C, até o momento da dosagem do antibiótico. Esta foi realizada no período de uma semana após a colheita do sangue. A dosagem do antibiótico foi feita pelo método de difusão em agar, usando-se a *Sarcina lutea* ATCC 9341, como organismo teste e o "antibiotic medium" nº 1 (Difco), como substrato.

Resultados

Na Tabela 1 podem ser observados os níveis séricos que a bacampicilina atingiu nos 12 voluntários, após 1/2, 1, 1 1/2, 2, 4, 6 e 8 horas da administração oral de 800mg da droga, em uma dose única. Na fig. 2 está representada a concentração média da bacampicilina, no sangue dos 12 voluntários, nos mesmos períodos.

Figura 2 — Média das concentrações séricas de bacampicilina expressas em microgramas por ml de sangue em 12 voluntários saudáveis. Valores de 0.5, 1, 1.5, 2, 4, 6 e 8 horas após uma única dose de 800mg



Após 1/2 hora de administração da bacampicilina, todos os voluntários apresentaram, no sangue, o antibiótico em concentrações superiores às concentrações inibitórias "in vitro" de ampicilina para os germes sensíveis em geral. Após 4 horas de administração, embora as concentrações sejam inferiores às referentes ao período de 1/2 hora, podem ser ainda consideradas inibitórias para a maioria dos germes sensíveis à ampicilina. A concentração média máxima da droga ocorreu 1 hora depois da administração. Nesta fase, a menor concentração atingida foi de 7,94 μ g/ml em um voluntário e a maior foi de 19,9 μ g/ml em outro. Em três voluntários as concentrações de 1 hora e 1/2 foram superiores às de 1 hora, em um dos quais pouco superior (Tabela 1).

Discussão

Os níveis séricos de bacampicilina, obtidos no presente trabalho, correspondem, de maneira bastante uniforme, aos relatados por outros autores como Magni & col. (8) e Vargas-Arreola & col. (15). Além de precoces, são realmente bastante elevados e superiores aos que têm si-

do encontrados para a ampicilina e também para outras aminopenicilinas (2, 5, 6, 13). Com relação a este fato, é indiscutível que a bacampicilina representa um importante progresso sobre outros antibióticos da família da ampicilina.

Assim como a bacampicilina, pró-droga da ampicilina, transforma-se inteiramente em ampicilina, como já mencionado, esta é, portanto, a substância ativa no organismo. Deste modo, tanto a ampicilina como a bacampicilina, têm a mesma atividade bactericida "in vivo", e as vantagens da bacampicilina são primariamente de ordem farmacocinética. Obviamente, níveis séricos mais precoces e mais elevados favorecem melhores resultados terapêuticos, especialmente em infecções causadas por bactérias moderadamente sensíveis (11, 12), através de uma penetração tissular mais acentuada (4, 7, 11, 12).

Agradecimentos

O autor agradece a Astra Química do Brasil Ltda. — Departamento Científico, pelo gentil fornecimento do medicamento utilizado neste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Bodin, N.O.; Ekström, B.; Forsgren, U.; Jalar, L.P.; Magni, L.; C.H. & Sjöberg, B. — Bacampicillin: a new orally well-absorbed derivative of ampicillin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 8:518-525, 1975.
2. Bergan, T., Bratlid, D. & Brondbo, A. — Pharmacokinetics of bacampicillin in infants. *J. Antimicrob. Chemother.*, 4:79-84, 1978.
3. Carbon, C.; Contrepois, A.; Beauvais, C. & Lamotte — Barrillon, S. — Enhanced interstitial ampicillin levels after oral bacampicillin. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2:314-316, 1976.
4. Carbon, C.; Boussougant, Y. & Lamotte-Barrillon, S. — Étude pharmacologique clinique et thérapeutique de la Bacampicilline. *Medicine et Maladies Infectieuses*, 7:370-374, 1977.
5. Ekström, B.; Forsgren, U.; Magni, L.; Sjöberg, B.; Sjövall, J. & Tolf, R. — Bacampicillin, a well-absorbed pro-drug of ampicillin: a report on properties and clinical experiences. *Journal of Drug Research*, 2:39-44, 1977.
6. Ekström, B.; Forsgren, U.; Jalar, L.P.; Magni, L.; Sjöberg, B. & Sjövall, J. — Preclinical studies with bacampicillin: a new orally well absorbed prodrug of ampicillin. *Drugs Exptl. Clin. Res.* p., 3-10, 1977.
7. Maesen, F.P.V.; Beeuwkes, H.; Davies, B.I.; Buyten-dijk, H.J.; Brombacher, P.J. & Wessman, J. — Bacampicillin in acute exacerbations of chronic bronchitis: a dose/range study. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2:279-285, 1976.
8. Magni, L.; Sjöberg, J. & Wessman, J. — Clinical pharmacological studies with bacampicillin: penicillins and cephalosporins. London International Congress of Chemotherapy, 9th July, 1975: Proceedings. New York, London, Plenum Press, 1976.
9. Rozencweig, M.; Staquet, M. & Klastersky, J. — Antibacterial activity and pharmacokinetics of bacampicillin and ampicillin. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 19:592-596, 1976.
10. Simon, C. — Antibiotikaspiegel in Serum Speichel tragen und Hautblasen flüssigkeit. *Infection* (supplement 2), 4:91-96, 1976.
11. Simon, C.; Malerczyk & Klaus, M. — Absorption of bacampicillin and ampicillin and penetration into body fluids (skin blister fluid, saliva, tears) in healthy volunteers. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 14:228-232, 1978.
12. Simon, C., Malerczyk, V. & Klaus, M. — The clinical pharmacology of Bacampicillin in comparison with Am-picillin. *Med. Klin.*, 73:910-913, 1978.
13. Sjövall, J.; Magni, L. & Bergan, T. — Pharmacokinetics of bacampicillin compared with those of ampicillin, pivampicillin, and amoxycillin. *Agents Chemother.*, 13:90-96, 1978.
14. Swahn, A. — Gastrointestinal absorption and metabolism of two labelled ampicillin esters. *Europ. J. Clin. Pharmacol.*, 9:299-306, 1976.
15. Vargas-Arreola, F.; Galindo-Hernandez, Q.F.B.E.; Flores-Mercado; Diaz-González, C.; Diaz-González, L.; Límon-Limón, L.; Decanini-Terán, C.; & Salazar-Zúnica, A. — Farmacología clínica de la bacampicilina vs. ampicilina trihidratada. Determinación de niveles sanguíneos. *Invest. Med. Internacional*, 5:163-169, 1978.

Vitamin requirements of yeasts isolated from polluted seawater of Rio de Janeiro*

Allen N. Hagler
& Leda C. Mendonça-Hagler

Summary

519 strains of yeasts and yeast-like organisms were tested for ability to grow without vitamins. Sixty percent of the *Candida* strains and 88 percent of the other strains had vitamin requirements. The vitamin requirements of 53 representative strains were determined and of these 37 required biotin, 24 thiamine, and 14 pyridoxine. The requirements were partial with the exception of the essential requirements of *Torulopsis glabrata* for niacin and *Kloeckera apiculata* for inositol. Atypical vitamin requirements were noted for some species. Partial vitamin requirements did not appear to be important for distribution of yeasts in polluted seawater, but essential vitamin requirements may be significant.

Resumo

Exigências vitamínicas de leveduras de estuário marinho poluído no Rio de Janeiro

519 estirpes de leveduras e organismos similares a leveduras foram testados com relação à capacidade de crescer sem vitaminas. Dentre as estirpes de *Candida*, 60% exigiu vitaminas, o mesmo acontecendo com 80% das outras leveduras estudadas. As exigências de vitaminas de 53 estirpes, representativas da população de leveduras do estuário poluído, foram testadas. 37 estirpes exigiram biotina, 24 tiamina e 14 piridoxina, como fatores estimulantes de crescimento; *Torulopsis glabrata* exigiu niacina e *Kloeckera apiculata* inositol, como fator essencial de crescimento. Algumas espécies apresentaram resultados diferentes do encontrado na descrição taxonômica. A exigência de vitaminas, como fator estimulante do crescimento, aparentemente não interfere na distribuição de leveduras na água do mar poluída. Entretanto, essa exigência como fator essencial, pode ser importante no estabelecimento da poluição de águas marinhas.

Introduction

Yeasts vary in ability to grow without vitamins. Some species such as *Kloeckera apiculata* have essential vitamin requirements. In contrast some species such as *Candida krusei* grow optimally in media lacking vitamins and many species have less than optimum or partial growth in the absence of vitamins. The vitamins included in yeast nitrogen base are sufficient for growth of most yeasts and include niacin, pyridoxin, biotin, pantothenate, folic acid, thiamine, para-aminobenzoic acid, and inositol

(7). An exception are the psychrophobic yeasts which can have choline and carnitine requirements (8). Vitamin requirements are often useful in identification and are included in many species descriptions in "The Yeasts" (7).

The majority of 285 marine occurring yeasts studied by Ahearn and Roth (1) required at least one vitamin and only 8 of 28 species had prototrophic representatives. The only yeast in their study needing more than 2 vitamins was *Hanseniaspora valbyensis*. The most common requirement of the genera *Candida*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, and *Saccha-*

* Departamento de Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, 21491 Rio de Janeiro, Brazil.

romyces was biotin, but *Cryptococcus* and *Rhodotorula* usually required thiamine.

Our objective was to check for homogeneity of vitamin requirements between yeasts isolated from polluted seawater in South America with those previously reported for yeasts of predominantly cleaner waters in North America and to see which vitamin deficiencies can limit growth of yeasts in polluted estuarine water.

Material and Methods

Most of the 519 strains of yeast and yeast-like organisms were isolated from polluted seawater and sediments of a polluted estuary along the Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, but about 50 of the isolates were from clean seawater (5). Classification of 67 species was done according to Lodder (7), Barnett & Pankhurst (3), Arnold & Ahearn (2), and Cooke (4).

Screening for requirement of one or more vitamins for growth was done in the synthetic medium vitamin free yeast base (7) which was sterilized by filtration. Inoculation to a level of about 10^4 cells per ml was done from distilled water suspensions of yeasts from 24hr Sabouraud slants grown at 28°C. After one week of incubation at 25 to 28°C a second tube of vitamin free yeast base was inoculated from the first using a 2.5mm inner diameter wire loop. Growth readings were made in a Klett-Summerson colorimeter with a number 42 (blue) filter after two weeks incubation. If growth in vitamin free yeast base was significantly less than in a control medium of yeast nitrogen base with 1% glucose, the strain was considered to need vitamins.

Fifty seven vitamin requiring strains representing 37 species were tested by the subtractive technique employed by Ahearn & Roth (1) to determine which vitamins were required. Vitamin free yeast base was used to make a series of eight media each containing seven and lacking one of the following vitamins (concentrations in $\mu\text{g/liter}$): biotin (20), calcium pantothenate (2,000), folic acid (2), inositol (10,000), niacin (400), para-aminobenzoic acid (200), pyridoxine hydrochloride (400), riboflavin (200), thiamine hydrochloride (400). Vitamin free yeast base and vitamin free yeast base with all eight vitamins added were controls. Inoculation was made as noted above except that the suspension was made in vitamin free yeast base and was incubated at 25°C for 24 hours before inoculation. After one week incubation at 25°C a second set of tubes was inoculated from the

vitamin free yeast base control of the first set. All cultures were read in a colorimeter as noted above and strains were considered to require a vitamin when the medium lacking it had significantly less growth than the medium with all vitamins.

Results

More than half of the *Candida* strains and most of the other strains required one or more vitamins for growth (Table 1). All strains of *Candida krusei*, *C. steatolytica*, *C. utilis*, *C. membranaefaciens?*, *C. mogii?*, *Hansenula anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*, and three unidentified *Candida* species grew optimally without vitamins. *Candida lipolytica*, *C. sorbosa*, *C. valida*, *Pichia membranaefaciens*, *P. ohmeri*, *Prototheca zopfii*, *Rhodotorula rubra*, *Trichosporon penicillatum*, *Tr. variabile*, and *Aureobasidium pullulans* all included strains with optimal and suboptimal growth without vitamins.

Table 1 — Growth of 519 strains of yeast from polluted estuary water in vitamin free yeast base

| No vitamin requirements | | Partial or essential vitamin requirements | | |
|-------------------------|------------|---|------------|----|
| Number | Percentage | Number | Percentage | |
| <i>Candida</i> strains | 107 | 40 | 156 | 60 |
| Other strains | 31 | 12 | 223 | 88 |
| Total strains | 138 | 27 | 381 | 73 |

Representative strains of species requiring vitamins for growth usually needed biotin. Most vitamin requiring strains which did not need biotin required thiamine. Thiamine and/or pyridoxine were often required in conjunction with biotin (Tables 2 and 3). *Candida* and *Torulopsis* species which required vitamins all needed biotin except *C. lipolytica*, *C. humicola*, *C. brumptii?*, and one strain of *T. maris?* which required thiamine and *C. ciferrii?*, *C. sorbosa*, and *C. sorboxylosa* which required thiamine and pyridoxine. *Cryptococcus albidus* and *Rhodotorula rubra* did not require biotin but with the exception of one of three strains of *R. rubra* all required thiamine. The *R. rubra* strain which did not require thiamine was found to need pantothenate when first transferred from the Sabouraud maintenance medium but adapted to growth without vitamins after one transfer to vitamin free yeast base. All other strains except those of *Tr. cutaneum* required biotin.

Table 2 — Vitamins required by 53 strains of yeasts from polluted estuary water

| Vitamin | Number of strains requiring vitamin |
|-----------------|-------------------------------------|
| Biotin | 37 |
| Thiamine HCl | 24 |
| Pyridoxine HCl | 14 |
| Ca pantothenate | 4 |
| Niacin | 3 |
| Folic acid | 2 |
| Inositol | 1 |

Most of the vitamin requirements were only partial but *Torulopsis glabrata* had an essential requirement for niacin and *Kloeckera apiculata* for inositol. When vitamin requirements were partial colorimeter readings of the tube lacking the vitamin were about 1/4 to 1/2 of the reading for the complete medium. Generally colorimeter readings were lower in the medium lacking all vitamins than in the medium lacking only the required vitamin but containing the other seven. The exceptions to this were strains with essential requirements which did not grow in either medium.

Table 3 — Vitamin requirements of yeasts as determined by a subtractive method

| Species | Strains* | Vitamins required** |
|----------------------------------|--------------|---------------------|
| <i>Candida boidinii</i> | 157 | B |
| <i>Candida boidinii?</i> | 212 | B, F |
| <i>Candida brumptii?</i> | 69 | B, T |
| <i>Candida brumptii?</i> | 272 | T |
| <i>Candida ciferrii?</i> | 244 | T, P |
| <i>Candida dildensi?</i> | 131 | B, T |
| <i>Candida guilliermondii</i> | 21 | B |
| <i>Candida humicola</i> | 185 | T |
| <i>Candida ingens?</i> | 67 | B, T |
| <i>Candida intermedia</i> | 84, 245, 270 | B |
| <i>Candida lipolytica</i> | 71, 257, 281 | T |
| <i>Candida lusitaniae</i> | 276 | B, T, P |
| <i>Candida membranaefaciens?</i> | 118 | B |
| <i>Candida norvegensis</i> | 137 | B, P |
| <i>Candida parapsilosis</i> | 62, 150 | B |
| <i>Candida sake?</i> | 211 | B |
| <i>Candida shehatae</i> | 267 | B, T |
| <i>Candida sorbosa</i> | 28 | T, P |
| <i>Candida sp. A</i> | 76 | B |
| <i>Candida sorboxylosa</i> | 207, 75 | T, P |
| <i>Candida tropicalis</i> | 99, 34 | B |
| <i>Candida valida</i> | 73 | B |
| <i>Candida zeylanoides</i> | 46 | B |
| <i>Cryptococcus albidus</i> | 40 | T, Cp, N, F |
| <i>Debaryomyces hansenii</i> | 52 | B |
| <i>Kloeckera apiculata</i> | 90 | B, T, P, Cp, N, L |
| <i>Metschnikowia?</i> sp. | 152 | B |
| <i>Pichia kluuyeri</i> | 337 | B, P |
| <i>Pichia terricola</i> | 33, 156 | B, P |
| <i>Rhodotorula rubra</i> | 161 | B, T, P |
| <i>Rhodotorula rubra</i> | 35, 147 | T |
| <i>Torulopsis candida</i> | 81 | Cp |
| <i>Torulopsis ernobii?</i> | 18, 155 | B |
| <i>Torulopsis glabrata</i> | 153 | B |
| <i>Torulopsis holmii</i> | 39 | B, T, P, N |
| <i>Torulopsis maris?</i> | 165, 253 | B, Cp |
| <i>Torulopsis maris?</i> | 93 | T |
| <i>Torulopsis sp.</i> | 344 | B, T, P |
| <i>Torulopsis sp.</i> | 151 | B |
| <i>Trichosporon cutaneum</i> | 167 | B, T, P |
| <i>Trichosporon penicillatum</i> | 77 | T |
| | 50 | B |

* Yeast culture collection numbers of Laboratório de Ecologia Microbiana e Taxonomia, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

** Vitamins are abbreviated as follows: biotin = B; thiamine HCl = T; pyridoxine HCl = P; Ca pantothenate = Cp; niacin = N; folic acid = F; inositol = I

Discussion

Yeasts tentatively identified as *Candida ciferrii*, *C. ingens*, *C. shehatae*, *Torulopsis ernobii*, *T. gropengiesseri*, and *T. maris* (5) differed from standard descriptions including with respect to vitamin requirements. *Candida norvegensis*, *C. valida*, and *Cryptococcus albidus* which otherwise fit standard descriptions well differed in vitamin requirements. The transient requirement of *Rhodotorula rubra* strain 81 for pantothenate is not typical of the species. Three strains identified as the prototrophic species *C. sorbosa* were found to be auxotrophic and a representative strain was found to require the same vitamins as two strains of *Candida sorboxylosa*. These strains may have been *C. sorboxylosa* which were lacking the ability to assimilate xylose. Strains identified as *Torulopsis holmii* both required calcium pantothenate and may belong to the recently described species *Candida milleri* from which it is differentiated only by its DNA base composition and vitamin requirement (9).

We noted a synergistic effect among vitamins because there was always less growth in vitamin free medium than in medium lacking only the required vitamin, except when the requirement was essential. A similar difference was noted by Ahearn & Roth (1) between the "additive" and "subtractive" methods with essential requirements by the "additive" method often being found partial by the "subtractive" method.

Our results are in general agreement with Ahearn & Roth (1) with regard to the vitamins

required but we found essential requirements to be rare among our strains and they found essential requirements to be common. Biotin and thiamine were the most frequently required vitamins among marine yeasts. We found pyridoxine to be required by various yeasts of marine origin which were not included in their study and they found para-aminobenzoic acid to be required by all strains of *Rhodotorula minuta* and *R. aurantiaca* which were not included in our study. Marine and estuary yeasts as a group should be most affected by absence of biotin and thiamine and to a lesser degree by absence of pyridoxine and para-aminobenzoic acid, but since partial vitamin requirements were common among the prevalent yeasts of a polluted estuary we concluded that vitamin requirements are not usually important for distribution of yeasts in this environment. However the distribution of species with essential vitamin requirement may be influenced since *Kloeckera apiculata* was mainly associated with runoff entering the estuary after storms and *Torulopsis glabrata* was associated more with sediments than with water of the polluted estuary (5, 6).

Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and FINEP grant 527/CT. We thank Mrs. Martha Vargas for typing the manuscript and Rosângela Nunes Seixas for her technical assistance.

References

1. Ahearn, D.G.; & Roth Jr., F.J. — Vitamin requirements of marine occurring yeasts. *Devs. Ind. Microbiol.* (New York), 3:163-173, 1962.
2. Arnold, P.; & Ahearn, D.C. — The systematics of the genus *Prototheca* with a description of a new species *P. filamentosa*. *Mycologia*, 64:265-275, 1972.
3. Barnett, J.A.; & Pankhurst, R.J. — A new key to the yeasts: 434 species as approved by the CBS, a key for identifying yeasts based on physiological tests only. Amsterdam-London, North Holland Pub., New York, American Elsevier Pub., 1974.
4. Cooke, W.B. — A taxonomic study in the black yeasts. *Mycopathol. et. Mycol. Appl.*, 27:1-43, 1962.
5. Hagler, A.N. — Ecologia e taxonomia de leveduras em um estuário poluído e ambientes marinhos do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978. 400p. (Tese de Doutorado).
6. Hagler, A.N.; Santos, S.S.; & Mendonça-Hagler, L.C. — Yeasts of a polluted Brazilian estuary. *Rev. Microbiol.*, 10 (1):36-41, 1979.
7. Lodder, J. — The Yeasts: a taxonomic study. Amsterdam-London, North Holland Pub., 1970.
8. Travassos, L.R.R.G., & Cury, A. — Thermophilic enteric yeasts. *Annu. Rev. Microbiol.*, 25:49-74, 1971.
9. Yarrow, D. — *Candida milleri* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28:608-610, 1978.

Condições microbiológicas de produtos cárneos comercializados no Rio de Janeiro

Norma Kaufmann Robbs
& Paschoal Guimarães Robbs*

Resumo

Cem amostras de produtos cárneos (lingüiças, salsichas, "bacon", salames, patês e presuntos) foram examinadas em suas Contagens Padrão em Placas (CPP), cargas de bactérias indicadoras das condições higiênico-sanitárias e bactérias potencialmente patogênicas. A lingüiça foi o produto de qualidade microbiológica menos satisfatória, com CPP superior a 10^6 céls/g em 41,0% das amostras. Houve grande incidência (55,0%) de contagens de estreptococos fecais superiores a 10^3 céls/g. Coliformes fecais em números superiores a 10 céls/g foram observados em 11,0% das amostras. Dos microorganismos potencialmente patogênicos, *Staphylococcus aureus* foi o único problema, estando 13,0% das amostras com contagens superiores a 10^3 céls/g. *Salmonella* não foi detectada e *Clostridium perfringens* foi encontrado em apenas uma amostra.

Summary

Microbiological condition of meat products in Rio de Janeiro market

One hundred samples of meat products including portuguese sausage, hot dogs, bacon, salami, paté and ham, were examined for microbial quality using counts of total coliforms, fecal coliforms, fecal streptococci, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* and the standard plate count. In general, fecal coliform counts were lower than counts of fecal streptococci. Microbial counts were above current Brazilian standard for *Staphylococcus aureus* (10^3 /g) in 10 samples of portuguese sausage, two samples of salami and one sample of ham. *Clostridium perfringens* was found in one sample of portuguese sausage but the count did not exceed the 20/g Brazilian standard. *Salmonella* was not found in any of the samples. Portuguese sausage was also found to be of poorest microbial quality among the meat products tested by standard plate count 41% of samples above 10^6 /g and by fecal streptococci with 55% of the samples above 10^3 /g.

Introdução

Os produtos cárneos são freqüentemente responsáveis por surtos de toxinfecções alimentares, Bryan (3) cita, dentre outros alimentos causadores de intoxicação estafilocócica, nos E.U.A., durante o período de 1960 a 1970, os presuntos, salames e "bacon". Em 1973, no Canadá, presuntos e lingüiças estavam entre os produtos cárneos responsáveis por 118 incidentes, compreendendo 1.313 casos. *Staphylococcus aureus* foi o agente etiológico mais envolvi-

do, seguido por *Salmonella*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium botulinum* (17). Diversos surtos de intoxicação estafilocócica, envolvendo presuntos, foram detectados por Casman & Bennett (4).

Com o intuito de avaliar a qualidade microbiológica de produtos cárneos, alguns trabalhos já foram desenvolvidos no Brasil. No Estado de São Paulo (11, 12), os resultados médios para CPP e coliformes totais foram respectivamente: lingüiças defumadas (25 amostras), $9,5 \times 10^6$ céls/g e $1,8 \times 10^3$ céls/g; salames (16

* Departamento de Tecnologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, km 47 da antiga Rio-São Paulo, 23460 Seropédica, Rio de Janeiro.

amostras), $2,2 \times 10^6$ céls/g e 15,8 céls/g. Paio, copa, chouriço e mortadela também foram examinados, totalizando 120 amostras. Destas, 66,6% continham coliformes e 11,6% *Escherichia coli*. Em amostras de salsichas, recém-produzidas por cinco indústrias do Estado do Rio de Janeiro (8), 60% apresentavam CPP Inferior a 5×10^4 céls/g, 89% menos de 10 coliformes/g e 94,5% menos de 10^3 *S. aureus*/g. No Rio Grande do Sul, constatou-se alto índice de contaminação em produtos cárneos, provenientes de diversas fábricas daquele Estado (13). Na Inglaterra, lingüiças frescas foram examinadas em suas cargas de coliformes totais, enterócoccos e CPP (5). Nos E.U.A., Surkiewicz & col. (15) verificaram que, em 44 indústrias sob Inspeção Federal, havia CPP de até 5×10^5 céls./g; 88% das amostras continham até 100 *E. coli*/g e 75% até 100 *S. aureus*/g. *Salmonella* foi isolada de 28% das 560 amostras. Também nos E.U.A., pesquisas demonstraram que a positividade para a incidência de *S. aureus* em carnes e produtos cárneos é de aproximadamente 40% (7).

O presente trabalho objetivou colher informações sobre a situação microbiológica de diversos produtos cárneos, postos à venda nos principais supermercados do Rio de Janeiro, visando-se identificar os mais críticos na fase de distribuição e obter avaliação mais global perante a Resolução n.º 13/78 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), que estabelece os padrões microbiológicos para alimentos.

Material e Métodos

Cem amostras foram coletadas em supermercados do Estado do Rio de Janeiro, pelo período de um ano, assim distribuídas: 31 lingüiças (sete marcas diferentes); 16 salsichas (quatro marcas diferentes); 18 presuntos (três marcas diferentes); 8 patês (três marcas diferentes); 16 "bacons" (quatro marcas diferentes) e 11 salames (três marcas diferentes). As amostras coletadas foram mantidas em temperatura de refrigeração, até o momento da análise.

De cada amostra foram retiradas alíquotas de 25g e essas foram homogeneizadas em desintegrador "Waring Blender", com 225 ml de tampão fosfato, pH 7,0 (14). A partir desta suspensão inicial, foram preparadas diluições decimais e, em seguida, efetuadas as seguintes determinações:

a — Contagem Padrão em Placas (CPP) — O meio utilizado foi o agar padrão. A inoculação foi feita por incorporação e o período de incubação foi de 48 horas a 35°C (16).

b — Coliformes totais e fecais — Para coliformes totais, foi seguida a técnica do Número Mais Provável (NMP), recomendada por Thatcher & Clarck (16), utilizando-se no teste presumtivo, o caldo de lauril sulfato triptose, com incubação a 35°C por 24-48 horas e, no teste confirmativo, o caldo de verde brilhante lactose bílis 2%, com incubação também a 35°C por 24-48 horas. Na determinação do NMP de coliformes fecais, empregou-se o caldo E.C., com incubação a $45,5^\circ \pm 0,2^\circ\text{C}$ por 24-48 horas;

c — Streptococos fecais — Foi seguida a técnica recomendada pela Associação Americana de Saúde Pública (1), utilizando-se o "KF Streptococcal Agar", com incubação a 35°C por 48 horas;

d — Staphylococcus aureus — Para todos os produtos, foram utilizadas as diluições 10^{-1} e 10^{-2} . Para maior sensibilidade na contagem, 1,0ml da diluição mais concentrada foi distribuído em cinco placas (0,2ml por placa); o meio de contagem empregado foi o agar Baird-Parker e a temperatura de incubação de 37°C por 24-48 horas; para a contagem das colônias e para a prova da coagulase foram seguidas as recomendações de Thatcher & Clarck (16);

e — Clostridium perfringens — Foi seguida a metodologia recomendada por Angelotti & col. (2), sendo entretanto a incubação feita em "Gaspak Anaerobic Systems", BBL.

f — Pesquisa de Salmonella — Foi utilizada a técnica recomendada por Thatcher & Clarck (16), com pré-enriquecimento de 25g da amostra em 225ml de caldo lactosado a 35°C por 24 horas, enriquecimento seletivo em caldo de tetracionato e caldo de selenito cistina a 35°C por 24 horas, seguido de plaqueamento em agar verde brilhante e agar SS com incubação a 35°C por 24 horas. As colônias suspeitas isoladas foram testadas, bioquímica e sorologicamente, de acordo com as recomendações de Thatcher & Clarck (16) e Edwards & Ewing (6).

Resultados e Discussão

Os resultados das distribuições percentuais das contagens de cada parâmetro analisado, para cada tipo de produto, encontram-se nas Tabelas 1, 2 e, para todas as amostras analisadas, nas Tabelas 3 e 4. Em nenhuma das amostras foi detectada a presença de *Salmonella*.

As lingüiças são os produtos mais críticos, em termos microbiológicos, na fase de distribuição (Tabelas 1 e 2). A CPP revela um quadro insatisfatório, pois 78% das amostras possuíam contagens superiores a 10^6 céls./g (Tabela 2). Salames também apresentaram elevado índice de amostras revelando contagens elevadas. Já nos demais produtos foram observadas positividades inferiores a 40% de contagens acima de 10^6 céls./g. De forma geral, 41% das amostras analisadas apresenta valores relativos a CPP, superiores a 10^6 céls./g. Estes resultados demonstraram que tais produtos, especialmente lingüiças, encontram-se com um percentual elevado de contagens acima do padrão de 10^6 céls./g estabelecido pela CNNPA (com carência de dois anos para estudo), por Ribeiro (10), de no máximo 10^6 céls./g e por Murray (9), de contagens inferiores a 5×10^5 céls./g e nunca superiores a 2×10^6 céls./g.

A incidência de indicadores de condições higiênico-sanitárias e contaminação fecal (coli-

formes totais e estreptococos fecais), revela sempre, maiores percentagens de contaminação, bem como maiores contagens, para o segundo índice (Tabelas 1 e 2).

Contagens superiores a 100 coliformes/g, prevista como máxima para produtos cárneos tratados pelo calor (10), foram encontradas apenas para lingüiças (29%), salsichas (37%) e presuntos (17%). Já para estreptococos fecais, contagens acima de 10^3 céls./g (10) foram detectadas em todos os produtos, exceto patês, sendo a menor positividade de incidência a de (30%) em "bacon" e a maior 84% em lingüiças (Tabela 2). Para os coliformes fecais, contagens superiores a 10/g foram observadas principalmente em lingüiças. Das 100 amostras principalmente analisadas, somente quatro fugiram aos padrões estabelecidos pela CNNPA, de no máximo 50 céls./g (Tabela 3).

Quanto aos microorganismos potencialmente patogênicos, o quadro está bastante satisfatório, pois contaminação por *Salmonella*, em 25g do produto, não foi evidenciada e apenas uma amostra apresentou *C. perfringens*, porém em quantidade inferior ao limite máximo previsto pela CNNPA (20 céls./g). Somente com relação a *S. aureus* maior atenção deve ser dada, pois contagens superiores a 10^3 céls./g, máximo previsto pela CNNPA, foram encontradas em 13 amostras, sendo a maior ocorrência verificada em linqüicas (10 amostras).

Tabela 1 – Distribuição das contagens e contagens médias de coliformes (NMP/g) *C. perfringens* (n.º/g) e *S. aureus* (n.º/g) nos diferentes produtos cárneos.

Tabela 2 — Distribuição das contagens e contagens médias de estreptococos fecais (nº/g) e CPP (nº/g) nos diferentes produtos cárneos

| Natureza da Amostra | Nº de Amostras | Tipo de Contagem | % Contaminação | < 10 ³ | | 10 ³ – 10 ⁴ | | 10 ⁴ – 10 ⁵ | | 10 ⁵ – 10 ⁶ | | 10 ⁶ – 10 ⁷ | | ≥ 10 ⁷ | | Contagem Média |
|-------------------------------|----------------|---|----------------|-------------------|------------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|-------------------|----------|--|
| | | | | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | Nº | % | |
| Linguiça cozida e/ou defumada | 31 | Cont. Padrão em Placas Estreptococos Fecais | 100 94 | 5 | 16 | 1 5 | 3 16 | 1 8 | 3 26 | 5 13 | 16 42 | 8 16 | 26 52 | 16 52 | 16 52 | 1,5 × 10 ⁷ 1,5 × 10 ⁵ |
| Salsicha | 16 | Cont. Padrão em Placas Estreptococos Fecais | 100 88 | 3 9 | 19 56 | 1 1 | 6 6 | 3 3 | 19 19 | 8 3 | 50 19 | 1 1 | 6 6 | | | 2,6 × 10 ⁵ 6,9 × 10 ⁴ |
| "Bacon" | 16 | Cont. Padrão em Placas Estreptococos Fecais | 100 63 | 1 11 | 6 68 | 7 2 | 44 13 | 2 2 | 13 13 | 2 1 | 12 6 | 6 38 | | | | 9,6 × 10 ⁵ 5,4 × 10 ³ |
| Salame | 11 | Cont. Padrão em Placas Estreptococos Fecais | 100 100 | 1 1 | 9 9 | 1 1 | 9 9 | 6 6 | 55 55 | 3 3 | 27 27 | 6 6 | 55 55 | 2 2 | 18 18 | 6,9 × 10 ⁶ 1,4 × 10 ⁵ |
| Presunto | 18 | Cont. Padrão em Placas Estreptococos Fecais | 100 67 | 7 11 | 39 61 | 5 3 | 28 17 | 1 2 | 5 11 | 3 2 | 17 11 | 2 2 | 11 11 | | | 2,5 × 10 ⁵ 2,1 × 10 ⁴ |
| Paté | 8 | Cont. Padrão em Placas Estreptococos Fecais | 100 88 | 8 8 | 100 100 | 6 6 | 75 25 | 2 2 | 25 25 | | | | | | | 1,3 × 10 ⁴ 1,9 × 10 ² |

Tabela 3 — Distribuição percentual das CPP (nº/g) e de estreptococos fecais (nº/g) nas amostras de produtos cárneos

| Tipo de Contagem | Nº/g | | | | |
|------------------------|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | < 10 ³ | 10 ³ – 10 ⁴ | 10 ⁴ – 10 ⁵ | 10 ⁵ – 10 ⁶ | ≥ 10 ⁶ |
| Cont. Padrão em Placas | 11 | 20 | 7 | 21 | 41 |
| Estreptococos fecais | 45 | 12 | 21 | 22 | 0 |

Tabela 4 — Distribuição percentual das contagens de coliformes totais (NMP/g), coliformes fecais (NMP/g), *C. perfringens* (nº/g) e *S. aureus* (nº/g) nas amostras de produtos cárneos

| Tipo de Contagem | NMP/g ou nº/g | | | | | | |
|-----------------------|---------------|------|---------|---------|----------------------|-----------------------------------|-------------------|
| | 0 | < 10 | 10 – 20 | 20 – 50 | 50 – 10 ² | 10 ² – 10 ³ | ≥ 10 ³ |
| Coliformes totais | 40 | 35 | | 5 | 2 | 7 | 11 |
| Coliformes fecais | 66 | 23 | 1 | 6 | | 2 | 2 |
| <i>C. perfringens</i> | 99 | | 1 | | | | |
| <i>S. aureus</i> | 78 | 1 | 2 | | | 6 | 13 |

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Professor Dr. Ernesto Hofer, da Fundação Oswaldo Cruz, pela identificação de amostras de enterobactérias,

ao Professor Dr. Sebastião Timó Laria, pelas valiosas sugestões e ao Técnico de Laboratório Sr. Cidinor Veiga dos Santos, pela colaboração no preparo dos meios de cultivo.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association — Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, APHA, 1976.
2. Angelotti, R.; Hall, H.E.; Foter, M.J. & Lewis, K.H. — Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. Appl. Microbiol., 10:193-199, 1962.
3. Bryan, F.L. — Microbiological food hazards today: based on epidemiological information. Food Technol., 9:52-66, 1974.
4. Casman, E.P. & Bennett, R.W. — Detection of Staphylococcal enterotoxin in food. Appl. Microbiol., 13:181-189, 1956.
5. Dowdell, M.J. & Board, R.G. — A microbiological survey of British fresh sausage. J. Appl. Bacteriol., 31:378-396, 1968.
6. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of Enterobacteriaceae. Minneapolis, Burgess, 1962.
7. Jay, J.M. — Further studies on *Staphylococci* in meats. III — Occurrence and characteristics of coagulase-positive strains from a variety of nonfrozen market cuts. Appl. Microbiol., 10:247-251, 1962.
8. Mattos Neto, P.J. & Robbs, P.G. — Estudo bacteriológico em salsichas produzidas no Estado da Guanabara. Rev. Med. Vet., 10:195-204, 1975.

9. Murray, J.G. — Microbiological standards for food. Proc. IFST, 8:81-88, 1975.
10. Ribeiro, A.M.R. — Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 5:17-25, 1974.
11. Rogick, F.A.; Sandoval, L.A. & Dias, A.S. — Estudo sobre a bacteriologia de embutidos consumidos na cidade de S. Paulo. I — Bacteriometria. Bol. Ind. Animal. (S. Paulo), 23:249-252, 1965-1966.
12. Rogick, F.A.; Sandoval, L.A. & Dias, A.S. — Estudo sobre a bacteriologia de embutidos consumidos na cidade de S. Paulo. II — Colimetria. Bol. Ind. Animal. (S. Paulo), 23:253-256, 1965-1966.
13. Schneider, I.S. — Aspectos bacteriológicos de produtos embutidos. Rev. Fac. Med. Vet. (S. Paulo), 5(1):97-112, 1953-1954.
14. Sharf, J.M. — Exame microbiológico de alimentos. São Paulo, Polígono, 1972.
15. Surkiewicz, B.F.; Johnston, R.W.; Elliott, R.P. & Simmons, E.R. — Bacteriological survey of fresh pork sausage produced at establishments under Federal Inspection. Appl. Microbiol., 23:515-520, 1972.
16. Thatcher, F.S. & Clarck, D.S. — Analisis microbiológico de los alimentos. España, Zaragoza, Ed. Acribia, 1973.
17. Tood, E.C.D. — The frist annual summary of food-borne disease in Canada. J. Milk Food Technol., 39:426-431, 1976.

Comparação da resistência a drogas de organismos Gram-negativos aeróbios isolados nos E.U.A. e no Brasil

José Ximenes*

Wilson Fry**

Claudio K. Hirai*

& Igor Mimica***

Resumo

Comparação dos níveis de resistência de organismos Gram-negativos aeróbios, isolados em várias regiões do Brasil e organismos da mesma espécie isolados nos Estados Unidos da América (EUA), foi feita com relação a: Ampicilina, Carbenicilina, Cefalotina, Cloranfenicol, Colistina, Estreptomicina, Gentamicina, Kanamicina, Neomicina, Polimixina, Tetraciclina. As seguintes bactérias foram usadas: *Escherichia coli*, *Enterobacter hafniae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Proteus rettgeri*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella sp.* e *Serratia sp.*. Os resultados mostram que 19.7% das cepas brasileiras testadas apresenta resistência média maior que as norte-americanas, 74.0% revela resistência média semelhante, e 6.3% resistência média inferior.

Summary

Comparison between the resistance to drugs shown by Gram-negative aerobic organisms isolated in Brazil and in the United States

A comparison between the resistance level of Gram-negative aerobic organisms isolated in several regions of Brazil with the same species of organisms isolated in the United States, shows that 19.7% of the Brazilian strains are more resistant than those from the United States; 74.0% have same sensitivity and 6.3% a sensitivity less than in that country.

Introdução

Desde a descoberta da Penicilina, dezenas e dezenas de antibióticos têm sido colocados à disposição da classe médica. Entretanto, à medida que são usados, ocorre seleção de organismos resistentes.

Considerando que o uso de antibióticos é bem mais restrito nos EUA do que no Brasil, foi feita a comparação de dados de antibiogramas realizados nos dois países, em 1975-1976. Tendo sido comparados organismos da mesma espécie, frente aos mesmos antibacterianos e se-

gundo a metodologia de Kirby-Bauer, recomendada pelo FDA (2,5), os dados servem de ponto de partida aos esforços voltados para o rebaixamento do atual nível de resistência bacteriana com o qual hoje nos deparamos.

Material e Métodos

Foram analisados os resultados obtidos com 25.450 amostras de organismos, sendo 23.950 norte-americanas (NA) e 1.500 brasileiras (B). Os resultados norte-americanos foram retirados

* Departamento de Metabolismo de Drogas e Farmacocinética, da Bristol-Myers Company International Division, Rua Carlos Gomes, 924, Caixa Postal 2240, 01000 São Paulo SP.

** Departamento de Pesquisas Clínicas da Bristol-Myers Company International Division — Região Sul, América do Sul.

*** Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, Rua Dr. Césario Mota Jr., 112, 01221 São Paulo SP.

do Bac-Data (1), os brasileiros, de trabalho realizado por nós (6).

Foi utilizado, na análise estatística dos resultados, o teste do "Qui quadrado para diferentes proporções" (4) com $P \geq 98\%$.

As espécies e antibióticos comparados podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2. Nos gêneros *Pseudomonas*, *Salmonella* e *Serratia* foram englobadas várias espécies, a fim de se obter um número maior de organismos passível de ser comparado.

A nomenclatura dos organismos utilizada, foi a proposta no Bergey's Manual (3).

Resultados e Discussão

Os resultados da Tabela 1 foram obtidos do seguinte modo: primeiro, determinou-se para cada bactéria e cada antibiótico, a percentagem de resistência dos organismos isolados no Brasil; segundo, determinou-se a diferença de percentagem entre os valores obtidos no Brasil e aqueles obtidos nos EUA; e, terceiro, determinou-se estatisticamente, baseando-se no número de cepas de cada país, o nível de significância pelo método do "Qui quadrado para diferentes proporções" ($P \geq 98\%$).

Portanto, foi colocada nesta Tabela, apenas a percentagem de organismos resistentes, isolados no Brasil, tendo como base a resistência dos organismos isolados nos EUA.

Na Tabela 2 o mesmo processo foi utilizado, só que, neste caso, os valores percentuais de resistência encontrados, para os organismos isolados no Brasil, foram inferiores àqueles indicados nas Tabelas norte-americanas.

As Tabelas 1 e 2 mostram, ainda, a média de resistência ou sensibilidade dos organismos como um todo frente aos principais antibacterianos em uso no momento no Brasil.

Finalmente, os percentuais de 19.7% de resistência e 6.3% de sensibilidade foram obtidos pelas médias das Tabelas 1 e 2 ficando os 74.0% restantes para os organismos que não mostraram diferenças significativas nas comparações efetuadas.

Tudo faz crer que o aparecimento de maior número de organismos resistentes, isolados no Brasil, em comparação com aqueles dos EUA, é motivado, primeiro, pelo uso mais intensivo de antibióticos, em consequência da falta de controle oficial, que venha impedir a automedicação da população; segundo, pela falta, por parte do clínico, de um critério mais rigoroso na

Tabela 1 — Porcentagem (19.7%) significativa de resistência de organismos Gram-negativos aeróbios isolados no Brasil, em relação aos isolados nos EUA

| Organismos | Antibacterianos | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----------------|---------------|------------|---------------|-----------|----------------|-------------|------------|-----------|------------|--------------|
| | Ampicilina | Carbenicilina | Cefalotina | Cloranfénicol | Colistina | Estreptomicina | Gentamicina | Kanamicina | Neomicina | Polimixina | Tetraciclina |
| <i>Enterobacter hafniae</i> | 35 | 31 | — | 38 | — | 30 | 25 | 27 | — | — | — |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | — | 18 | — | 29 | 9 | 35 | 15 | 19 | 33 | — | 34 |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | — | 20 | — | 10 | 16 | 23 | 11 | 16 | 25 | — | 10 |
| <i>Escherichia coli</i> | 24 | 32 | — | 39 | 3 | 29 | 9 | 21 | 33 | 3 | 34 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 21 | 19 | 8 | 20 | — | 20 | 10 | 16 | 11 | — | — |
| <i>Proteus morganii</i> | — | 14 | — | 18 | — | 25 | 15 | 10 | 30 | — | 24 |
| <i>Proteus rettgeri</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Proteus vulgaris</i> | — | 16 | — | 19 | — | 20 | — | 14 | — | — | 14 |
| <i>Salmonella sp.</i> | 46 | 35 | 29 | 36 | — | 30 | 11 | 30 | 60 | — | 36 |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | 2,7 | — | — | — | — | — | 14 | 11 | 12 | — | 12 |
| <i>Serratia sp.</i> | — | — | — | — | — | 26 | — | — | — | — | — |
| Média | 25,7 | 23,1 | 18,5 | 26,1 | 9,3 | 26,4 | 13,8 | 18,2 | 29,1 | 3,0 | 23,4 |

Tabela 2 — Porcentagem (6,3%) significativa de sensibilidade de organismos Gram-negativos aeróbios isolados no Brasil, em relação aos isolados nos EUA

| Organismos | Antibacterianos | Ampicilina | Carbenicilina | Cefalotina | Cloranfenicol | Colistina | Estreptomicina | Gentamicina | Kanamicina | Neomicina | Polimixina | Tetraciclina |
|-------------------------------|-----------------|------------|---------------|------------|---------------|-----------|----------------|-------------|------------|-----------|------------|--------------|
| <i>Enterobacter hafniae</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | 12 | — | 14 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | — | — | 68 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Escherichia coli</i> | — | — | 8 | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Proteus mirabilis</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 6 |
| <i>Proteus morganii</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Proteus rettgeri</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Proteus vulgaris</i> | — | — | 28 | — | — | — | — | — | — | — | 12 | — |
| <i>Salmonella sp.</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Pseudomonas sp.</i> | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| <i>Serratia sp.</i> | 12 | — | 25 | — | — | — | — | — | — | — | 34 | — |
| Média | 12 | — | 28,6 | — | — | — | — | — | — | — | 23 | 6 |

escolha e administração do antibiótico adequado; terceiro, pela incidência, muito maior, de doenças infecciosas no Brasil, o que acarretaria grande consumo de antibacterianos, gerando maior resistência das bactérias às drogas.

Em nosso trabalho anterior (6), foram feitas algumas observações que devem ser enfatizadas.

1. Necessidade de oficialização de uma metodologia padrão para a realização do antibiograma. Para isso, recomendamos o método de Kirby-Bauer, utilizado nos EUA.
2. Repetição, periódica e anual, de um estudo comparativo, como o presente, feita por ór-

gão governamental ou não, que permita melhor avaliação do nível de sensibilidade bacteriana no Brasil.

3. Colaboração maior entre os bacteriologistas do país, no sentido de usar uma única metodologia e organizar tabelas de resistência bacteriana, para conhecimento à classe médica.

Com a adoção destas medidas e a ajuda do clínico, no sentido de usar critério mais rigoroso na administração do antibacteriano, acreditamos que os objetivos sejam alcançados de imediato.

Referências Bibliográficas

1. Bac-Data — Medical Information Systems. USA, New Jersey, 1975-1976.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Path., 45:493-496, 1966.
3. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1974.
4. Downie, N.M. & Heath, R.W. — Basic Statistical Methods. 4 ed. New York, Harper & Row Publishers, 1974.
5. Food and Drug Administration — Standardized disc of susceptibility test. Federal Register, 37:20.527-20.529, 1972.
6. Ximenes, José; Fry, Wilson; Mimica, Igor & Hirai, Cláudio K. — Sensibilidade de bacilos Gram-negativos aeróbios no Brasil: mapeamento bacteriológico. A Folha Médica, 74:569-579, 1977.

Inhibition of *Staphylococcus aureus* S6 growth by a melanoidin obtained from a reaction between glucose and glycine*

Sergio Roberto de Andrade Leite**

Hidetake Imasato***

& Paulo Anna Bobbio****

Summary

A melanoidin obtained from a reaction between glucose (1.25M) and glycine (0.66M) in citrate buffer 0.05M pH6.0, heated at 90°C, has decreased the growth specific rate of *Staphylococcus aureus* S6 by 46% when added at a concentration of 1.5% in the culture medium. On the other hand, a culture medium dialysed against the same volume of other medium that contained 3.0% of melanoidin, decreased by only 10% the growth specific rate, what suggests other inhibition mechanism beyond the withdraw of metallic ions (particularly Fe³⁺) from the medium by the melanoidin.

Resumo

Inibição do crescimento do Staphylococcus aureus S6 por uma melanoidina obtida da reação entre glicose e glicina

A melanoidina obtida da reação envolvendo glicose (1,25M) e glicina (0,66M) em tampão citrato 0,05M pH6,0, aquecidas a 90°C, diminuiu a velocidade específica de crescimento do *Staphylococcus aureus* S6 de 46%, quando adicionada numa concentração de 1,5% no meio de cultura. Por outro lado, o meio de cultura, dialisado contra igual volume de outro meio contendo a melanoidina a 3,0%, diminuiu de apenas 10% a velocidade específica de crescimento, sugerindo que existe outro mecanismo de inibição, além da retirada de íons metálicos (Fe³⁺, em particular) do meio, pela melanoidina.

Introduction

Melanoidins are dark polymers, final products from the reaction between carbonyl and amine compounds (5). Melanoidins bind themselves with metallic ions, such as Cu²⁺, Fe³⁺, Al³⁺ and Zn²⁺ (1,2). Gomyo & Horikoshi have also determined the stability constants of the complexes with Cu²⁺ and Fe³⁺ (1).

The capacity of melanoidins to chelate metallic ions, suggests the possibility that such pigments may inhibit the growth of some microorganisms. For this particular test, *Staphylococ-*

cus aureus S6 was chosen due to its requirement of Fe³⁺ ions.

Material and Methods

Melanoidin synthesis — A solution of 1.25M glucose and 0.66M glycine (E. Merck, Darmstadt, Germany) in citrate buffer 0.05M, pH 6.0, was heated in a thermostated water bath at 90°C for 38 hours, until an absorbance of about 0.200 was attained in a thousand fold diluted sample of the reaction mixture.

* Partly supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

** Fellow from CAPES. Present address: Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Bloco 4, 01000 São Paulo, SP, Brasil.

*** Fellow from FAPESP. Present address: Universidade de São Paulo, Instituto de Química, Bloco 10, 01000 São Paulo, SP, Brasil.

**** Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Ciências de Alimentos, 13100 Campinas, SP, Brasil.

The pH of the solution was adjusted with 5.0N sodium hydroxide to the initial value at 8 hour intervals. The reaction mixture was dialysed against distilled water through a celophane membrane for 24 hours. The solution was then concentrated in a low pressure flash evaporator.

Caracterization of the melanoidin — The nitrogen content was determined by the Kjeldahl method, as modified by Koch & McMeekin (3). Carbon and hydrogen were determined at Alfred Bernhardt Analytische Laboratorien, West Germany, by the classical Liebig method, which consists of sample combustion followed by determination of the carbon dioxide and water formed.

The average molecular weight was determined by Sephadex G-100 gel filtration (Sigma Chemical Co., Mo., USA), using standard globular proteins for column calibration (4,9).

Microorganism growth — The stock culture of *Staphylococcus aureus* S6 was kept in a refrigerator at 5°C on a solid medium and replicated every 20 days. For the inoculum and the experiments a liquid medium was employed (6).

A series of test tubes with 5.0ml of the culture medium, containing 0.5, 1.0 and 1.5% melanoidin, in duplicate, was inoculated with 0.1ml of the inoculum and warmed up at 37°C in an air-heated shaker (New Brunswick Scientific Co., NJ, USA). The growth was followed up by periodic readings of the absorbance at 900nm.

In a second experiment, a culture medium was used which was previously dialysed for 116 hours against a similar medium containing 3.0% melanoidin. Melanoidin was expected to withdraw and chelate the iron ions from the medium without melanoidin.

Results and Discussion

Synthetized melanoidin was a dark brilliant powder, soluble in water and insoluble in the ordinary organic solvents, with the following elementary composition: C, 52.0%; H, 5.3%; N, 5.1%; O, 37.6% and an average molecular weight of 8300 ± 500 .

The growth charts of *S. aureus* S6 are shown in Figures 1 and 2 and its constant growth rates in Tables 1 and 2.

Figure 1 — Growth of *Staphylococcus aureus* S6 in the culture medium containing 0.5% (x), 1.0% (□), 1.5% (Δ) of melanoidin, and in the culture, medium without melanoidin (○), incubated at 37°C.

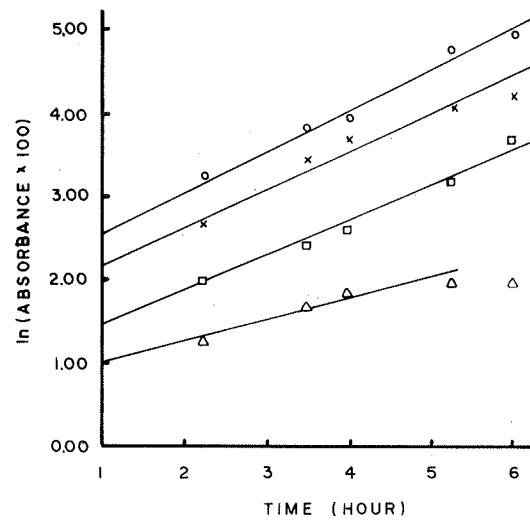


Figure 2 — Growth of *Staphylococcus aureus* S6 in the culture medium dialysed against a similar culture medium containing 3.0% of melanoidin (Δ), and in the non-treated culture medium (○), incubated at 37°C.

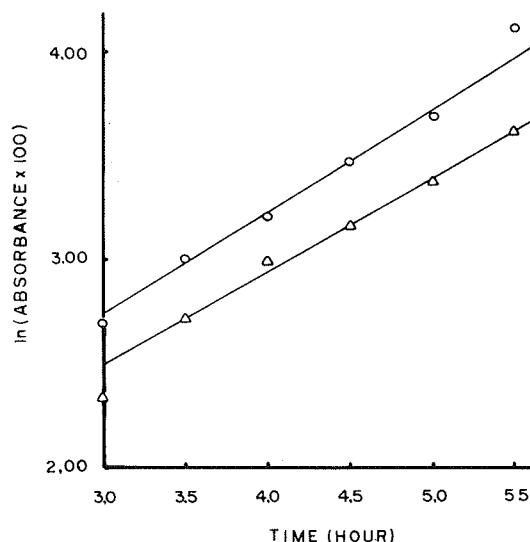


Table 1 — Growth of *Staphylococcus aureus* S6 in the absence and in the presence of melanoidin

| Melanoidin concentration in the culture medium (%) | Growth specific rate* (h^{-1}) | Decrease in the growth specific rate (%) |
|--|---|--|
| 0.0 | 0.50 | — |
| 0.5 | 0.47 | 6.0 |
| 1.0 | 0.43 | 14 |
| 1.5 | 0.27 | 46 |

* Angular coefficient of the graph $\ln(A \times 100)$ versus time

Table 2 — Growth of *Staphylococcus aureus* S6 in a dialysed* and in an undialysed culture medium

| Culture medium | Growth specific rate** (h^{-1}) | Decrease in the growth specific rate (%) |
|----------------|--|--|
| undialysed | 0.50 | — |
| dialysed | 0.45 | 10 |

* Dialysed against a medium containing 3.0% melanoidin

** Angular coefficient of the graph $\ln(A \times 100)$ versus time

The melanoidin inhibited growth of *Staphylococcus aureus* S6, with a decrease of 46% in the specific growth rate at a melanoidin concentration of 1.5%, which is very high in comparison with the usual concentrations in foods.

The experiment with the dialysed medium against melanoidin was the test to check whether such an inhibition was caused by a direct action to the bacterial cell or by the withdrawal

of some dialysable nutrient from the culture medium, in particular Fe^{3+} ions. A 10% inhibition in this case suggested that the withdrawal of the iron ions was not the unique mechanism, but that there would be other more important phenomena. This result is not unexpected, since it was demonstrated that very small concentrations, 0.01 to $0.02 \mu\text{g Fe/ml}$, were sufficient for the growth of the *S. aureus* S6 (8), and the stability constant of melanoidin- Fe^{3+} complex is not very high, i.e., around 10^4M^{-1} (4).

Acknowledgements

We are thankful to Prof. Fernando Carlos Pagnocca (UNESP — Rio Claro) for the microorganism supply, to Prof. Sonia P. C. de Salzberg (UNICAMP) for the laboratory admittance and to Mr. Wilson Ruivo de Souza, for reading the manuscript.

References

1. Gomyo, T. & Horikoshi, M. — On the interaction of melanoidin with metallic ions. *Agr. Biol. Chem.*, 40:33-40, 1976.
2. Kajimoto, G.; Yoshida, H. & Takamori, Y. — Studies on the metal protein complex. V — Reaction between the browning reaction products from glycine and reducing sugars and metals. *J. Japan Oil Chem. Soc.*, 24:15-21, 1975.
3. Koch, F. C. & McMeekin, T. L. — A new direct nesslerization micro-kjeldahl method and a modification of the Nessler-Folin reagent for ammonia. *J. Am. Chem. Soc.*, 46:2066-2069, 1924.
4. Leite, S. R. A. — Propriedades de melanoidinas obtidas por reação entre glucose e glicina. Universidade Estadual de Campinas, 1979. (Tese de Mestrado).
5. Maillard, L. C. — Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoïdines par voie méthodique. *Compt. Rend.*, 154:66-68, 1912.
6. Reiser, R. F. & Weiss, K. F. — Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. *Appl. Microbiol.*, 18:1041-1043, 1969.
7. Shade, A. L. — Significance of serum iron for the growth, biological characteristics and metabolism of *S. aureus*. *Biochem. Z.*, 338:140-148, 1963.
8. Theodore, T. S. & Shade, A. L. — Growth of *Staphylococcus aureus* in media of restricted and unrestricted inorganic iron availability. *J. Gen. Microbiol.*, 39:75-83, 1965.
9. Whitaker, J. R. — Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on Sephadex. *Anal. Chem.*, 35:1950-1953, 1963.

Ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* que fermenta a lactose tardivamente

Maria Regina Fernandes de Toledo*

Maria Henriqueta Lemos dos Reis*

Jayme Murahovschi**

Roberto Cury**

Sonia Regina Testa da Silva Ramos***

Eraldo Samogin Fiore**

Eric Yehuda Schussel**

& Luiz Rachid Trabulsi*

Resumo

É descrita uma variante de *Salmonella typhimurium* que fermenta a lactose entre 2 e 6 dias, suas colônias formando papilas vermelhas em agar MacConkey. A capacidade de fermentar a lactose é transferível por conjugação mas não eliminada por acridina. Esta variante é resistente à maioria dos antibióticos, incluindo gentamicina. Entre 249 crianças com diarréia, esta variante foi encontrada em 21 (8,4%), representando 75% das salmonelas isoladas. Entre 100 crianças normais foi encontrada em 2 casos.

Summary

Occurrence of a Salmonella typhimurium variant, which ferments lactose slowly, in São Paulo, Brazil

It is described a variant of *Salmonella typhimurium* which ferments lactose in 2 to 6 days, its colonies presenting red pappilli, in MacConkey medium. The capacity to ferment lactose is transferred to *E. coli* K12 by conjugation but it is not cured by acridine orange. Among 249 children with diarrhea the variant was found in 21 (8.4%), which represents 75% of the *Salmonella* strains isolated. Among 100 children without diarrhea it was found in 2. This variant is resistant to most antibiotics including gentamycin.

Introdução

Embora a *Salmonella typhimurium* seja uma bactéria que normalmente não fermenta a lactose, a partir de 1971 passou a ser bastante frequente em hospitais infantis de São Paulo uma variante que fermenta a lactose em 24 horas. Nos levantamentos realizados esta variante representava em torno de 50% das amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas (2, 5, 7), tendo sido verificado que a capacidade para fer-

mentar a lactose era determinada por um plasmídio, transferível por conjugação (1).

O presente trabalho tem a finalidade de relatar a descoberta, freqüência e algumas características de uma outra variedade de *Salmonella typhimurium* que, aparentemente, está predominando nas fezes de crianças com diarréia em São Paulo. Esta variante fermenta a lactose tardivamente, característica esta também transferível por conjugação.

* Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 862 — 3º andar, 04023 São Paulo SP.

** Clínica Infantil do Ipiranga, Av. Nazaré, 01000 São Paulo, SP.

*** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 01000 São Paulo SP.

Material e Métodos

Entre fevereiro e novembro de 1977, foram feitas coproculturas de 349 crianças de ambulatório, da Clínica Infantil do Ipiranga e do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sendo 249 com diarréia e 100 não apresentando sinais de afecções digestivas. A cultura foi feita por semeadura das fezes em meios de MacConkey, SS e Hektoen, este último antes e após enriquecimento em tetracionato. A identificação das amostras de *Salmonella* foi realizada segundo os métodos descritos por Edwards & Ewing (4). A fermentação da lactose foi verificada em placa de agar MacConkey e em caldo lactosado. Os experimentos de transferência da capacidade para fermentar a lactose foram realizados de acordo com Affonso & col. (1); os de eliminação do caráter lac com acridina, segundo Hirota (6) e os testes de sensibilidade, pelo método de Bauer & col. (3).

Resultados

Verifica-se na Tabela 1 que das 249 crianças com diarréia 28 (11,2%) apresentavam *Salmonella* nas fezes sendo que 21 (8,4%) eram portadoras da variante lactose tardia de *Salmonella typhimurium*. Das 100 crianças sem diarréia, 2 apresentaram a variante lactose tardia. Das 31 salmonelas isoladas nesta casuística, 23 (74,2%) eram lactose tardia.

No sentido de verificar a distribuição desta variante, foram estudadas até o momento, 20 amostras de *Salmonella typhimurium* isoladas entre 1962 e 1971, sendo 15 provenientes de São Paulo e 5 de outras regiões. Nenhuma das amostras foi capaz de fermentar a lactose.

Comportamento das amostras em meio de MacConkey e em caldo lactosado — As colônias de todas as amostras eram tipicamente lactose negativas, após 24 horas de incubação a 37°C, algumas passando a apresentar papilas vermelhas, indicando fermentação da lactose, a partir de 48 horas. Após 5 dias de incubação a maioria das colônias, das 23 amostras, apresentava papilas. Em caldo, a fermentação da lactose ocorria entre 2 e 6 dias de incubação a 37°C.

Resistência a drogas — Encontram-se na Tabela 2 os modelos de resistência apresentados pelas 23 amostras da variante lactose tardia, devendo-se notar que 18 (78,3%) eram simultâ-

Tabela 1 — Freqüência de isolamento da variante lactose tardia de *Salmonella typhimurium*, das fezes de crianças com e sem diarréia, entre fevereiro e novembro de 1977

| Crianças | Nº | <i>Salmonella</i> | | | | Total | |
|--------------|-----|-----------------------------------|-----|--------------------------------------|-----|---------|--|
| | | <i>typhimurium</i> lactose tardia | | <i>typhimurium</i> e outras lactoses | | | |
| | | Nº | % | Nº | % | | |
| Com diarréia | 249 | 21 | 8,4 | 7 | 2,8 | 28 11,2 | |
| Sem diarréia | 100 | 2 | 2,0 | 1 | 1,0 | 3 3,0 | |

Tabela 2 — Modelos de resistência das amostras da variante lactose tardia de *Salmonella typhimurium*

| Modelo de resistência | Nº amostras |
|-----------------------|-------------|
| SuETCKACeGSiRiPxAn | 2 |
| SuETCKACeGSiRiAn | 18 |
| SuETCKACeGSiAn | 1 |
| SuETCKACeGRiAn | 1 |
| SuETKACeAn | 1 |
| Total | 23 |

Su, sulfadiazina; E, estreptomicina; T, tetraciclina; C, cloranfenicol; K, canamicina; A, ampicilina; Ce, cefaloridina; G, gentamicina; Si, sisomicina, Ri, rifamicina, Px, polimixina; An, ácido nalidíxico

neamente resistentes a sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, ampicilina, cefaloridina, gentamicina, sisomicina, rifamicina e ácido nalidíxico. É interessante ressaltar que duas amostras, além da resistência às drogas mencionadas anteriormente, apresentavam resistência também à polimixina.

Transferência do caráter lac — Para os experimentos de conjugação foi obtida inicialmente uma linhagem da variante lactose tardia, que fermentava a lactose em 24 horas. A partir dessa, foram obtidos mutantes auxotróficos que foram, então, conjugados com a amostra de *E. coli* K12 3828 *F-lac-his*⁻. Após 24 horas de incubação, a mistura foi plaqueada em meio mínimo apropriado (1). Após 7 dias a 37°C, observou-se crescimento de transconjugantes *lac*⁺ de *E. coli* K12 3828, numa freqüência de $2,8 \times 10^{-8}$. Estes transconjugantes *lac*⁺ retransferiram o caráter lac para *E. coli* K12 RV *F-lac*⁻ na freqüência de $6,5 \times 10^{-4}$.

Eliminação do caráter lac pelo alaranjado de acridina — Foram tratadas pelo alaranjado de acridina a linhagem que fermentava a lactose em 24h, proveniente da variante lactose tardia de *S. typhimurium*, uma amostra de *E. coli* K12

RV que recebeu o caráter lac desta última e como controle, *E. coli* K12 RV/F'lac, na qual o plasmídio F'lac é eliminado em mais de 95% das células (8). A concentração de alaranjado de acridina foi de 60 μ g/ml. O caráter lac de *S. typhimurium* não foi eliminado, tanto da linhagem original de *Salmonella* como de *E. coli* K12 RV. Entretanto, o mesmo tratamento eliminou o fator F'lac de 99,7% das células de *E. coli* K12 RV/F'lac.

Discussão

Os resultados obtidos mostram que uma outra variedade de *Salmonella typhimurium* está ocorrendo em São Paulo, aparentemente com uma grande freqüência, pelo menos em casos de diarréia infantil. São necessários estudos epidemiológicos mais amplos para avaliar a freqüência real desta variante. Também seria interessante conhecermos melhor sua virulência, capacidade de crescimento e outras características. Sob o ponto de vista de isolamento e identificação a variante lactose tardia não oferece dificuldades maiores. Nos meios de isolamento como MacConkey, SS, Hektoen e outros meios contendo lactose, suas colônias são tipicamente lactose negativas após 24 horas de

incubação. Do mesmo modo, apresenta comportamento característico de salmonela não fermentadora de lactose em meios de identificação preliminar. No sentido de evitar enganos, basta que o bacteriologista esteja consciente de que as colônias desta variante podem começar a apresentar papilas lactose positivas após 48 horas de incubação e fermentar a lactose, em caldo, entre 2 e 6 dias. Estudos no sentido de verificar a estrutura antigênica completa desta variante estão em andamento.

O extenso número de marcas de resistência a drogas nas amostras da variante lactose tardia e a ausência do caráter lac em amostras de *Salmonella* isoladas entre 1962 e 1971 sugerem fortemente que esta variante foi selecionada recentemente. É mais uma evidência a favor da necessidade de adoção de medidas para reduzir o uso indiscriminado e intensivo de antibióticos em nosso meio.

Os experimentos de transferência sugerem que o caráter lac da variante lactose tardia é determinado por um plasmídio transferível por conjugação e não eliminável por alaranjado de acridina. Nestas duas características é semelhante ao plasmídio Ms.-lac transportado pela *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose em 24 horas (1). Estudos genéticos e físicos, para verificar se os 2 plasmídios são idênticos, estão em andamento.

Referências Bibliográficas

- Affonso, M.H.T.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. — Natureza genética da fermentação de lactose em amostras de *Salmonella typhimurium*. Rev. Microbiol., 8:110-116, 1977.
- Almeida, P.C.A. & Trabulsi, L.R. — Características culturais, bioquímicas, sorológicas e virulência de amostras de *Salmonella typhimurium* fermentadoras de lactose. Rev. Microbiol., 5:27-35, 1974.
- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C. & Turk, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of Enterobacteriaceae. 3 ed. Burgess Publishing Company, Minneapolis, 1972.
- Falcão, D.P.; Trabulsi, L.R.; Hickman, F.W. & Farmer III, J.J. — Unusual enterobacteriaceae: Lactose-positive *Salmonella typhimurium* which is endemic in São Paulo, Brazil. J. Clin. Microbiol., 2:349-353, 1975.
- Hirota, Y. — The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. Proc. Nat. Acad. Sci., 46:57-64, 1960.
- Pessôa, G.V.A. — Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora de lactose. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1972. (Tese de Doutoramento).
- Toledo, M.R.F.; Silva, R.M.; Almeida, R.G. & Trabulsi, L.R. — The influence of the host in the curing of a F'lac factor by acridine orange. Rev. Microbiol., 8:141, 1977.

**HBsAg, subtypes and HBsAb
in white and asiatic populations from
urban and rural communities
in the south of Brazil**

Clara F. Tachibana Yoshida*

Ana Maria C. Gaspar*

Keyla B. Feldman Marzochi**

& Hermann G. Schatzmayr*

Summary

A seroepidemiological survey was carried out in two different populations of white and asiatic people living in Londrina, Paraná, on the south region of Brazil. The asiatic population showed a prevalence of HBsAg higher than the white population, 4.14% and 2.05% respectively. The subtype adr, uncommon in Brazil, was found in asiatic population, beside the subtypes adw and ayw. Both populations showed approximately the same prevalence of HBsAb, 7.77% (asiatic population) and 7.69% (white population), although some variation occurred depending of age and regional living area.

Resumo

Antígeno HBs, subtipos e anticorpo anti-HBs em populações brancas e asiáticas de comunidades urbana e rural

Um estudo soroepidemiológico foi feito, em 2 populações diferentes de brancos e asiáticos em Londrina, Paraná, na região sul do Brasil. A população asiática apresentou uma prevalência de antígeno HBs mais alta que a população branca sendo 4,14% e 2,05% respectivamente. O subtipo adr, não encontrado comumente na população brasileira, foi encontrado na população asiática, além dos subtipos adw e ayw. Em relação ao anticorpo anti-HBs, ambas as populações apresentaram aproximadamente a mesma prevalência de 7,77% (asiáticos) e 7,69% (brancos), embora algumas variações tenham ocorrido dependendo do fator idade e da região onde vivem.

Introduction

It is known that the frequency of HBsAg detection in various parts of the world and its distribution in subpopulations depends on a variety of factors that have been found to be associated with sex, age, geography, ethnicity, occupation, immunologic responsiveness, etc.

The most known population in respect to these data is that of blood donors, although they are not representative of normal population. Thus, the prevalence of HBsAg carriers is much higher in some populations than others.

In North America and Northern Europe the prevalence rates are about 0.1 to 0.2% and in some regions of Africa, Asia and Oceania, the prevalence could reach 7.0 to 8.0%. In Central and South America, an average prevalence of 2.0% is estimated (15).

In tropical zones of Brazil, the prevalence of 5.1% could be found in populations of the interior of Amazon state (2), and in the cities of South and Southern areas, in subtropical zones, the prevalence rate is much lower, varying from 0.7% to 2.0% (1,13).

* Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Virologia Comparada, Caixa Postal 926, 20000 Rio de Janeiro — RJ, Brasil.

** Hospital Universitário — U.F.R.J., Caixa Postal 1859, 20000 Rio de Janeiro — RJ, Brasil.

The studied communities in Londrina, situated in the south of Brazil, showed distinct features of race and residence, constituted of asiatic (mainly Japanese and Japanese descendants) and white populations, both living in urban and rural areas. The present studies were undertaken to characterize the distribution of HBsAg and anti-HBs in different population, and also to investigate the subtypes of HBsAg involved in each population, which are apparently related to their origin country.

Material and Methods

Subjects — Blood samples were collected approximately in the same number of white and asiatic individuals. The rural population was composed of adults and children living in small farms located at the adjacency of Londrina city, mainly working on agriculture. 31 blood samples of adults and 33 blood samples of school age children of white individuals were collected. 38 blood samples of adults and 30 blood samples of school age children of asiatic population were also collected. The mean age of white and asiatic population in adults individuals were respectively 29 years old and 35 years old and in school age children 12 years old and 11 years old.

The urban population was also composed of adult individuals and school age children. The staff members of the hospital and students of the University were considered as adult population. 86 blood samples were collected from white adults (45 hospital staff members and 41 University students) and 88 blood samples were collected from asiatic adults (37 hospital staff members and 51 University students). The mean age either of white or asiatic adults was 24 years old. 45 blood samples of white school age children (mean age of 12 years old) and 37 blood samples of asiatic school age children (mean age of 11 years old) were also collected.

The total number was 195 blood samples of white individuals and 193 of asiatic individuals.

Determination of HBsAg — HBsAg was determined by reverse passive hemagglutination test — RPHA (7). Briefly, one drop (0.025ml) of each serum was twofold diluted in diluent buffer (P.B.S. pH 7.2, containing 1% sucrose, 0.02% NaN₃, 1% normal rabbit serum) by microtiter technique. The confirmation test was done using inhibition buffer solution containing

rabbit antibody to HBsAg. Sheep red blood cells sensitized with specific purified antibody was prepared in our laboratory according to the method of Imai & col. (8).

Determination of HBsAb — Passive hemagglutination test-PHA was used to determine the presence of HBsAb. The reaction was carried out as described above (7), and the confirmation was done using inhibition buffer solution containing HBsAg. PHA cells (SRBC sensitized with purified HBsAg) were kindly supplied by Dr. M. Mayumi, from Hepatitis Division. The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Tokyo, Japan.

Determination of subtypes — Subtypes were determined using counter immunoelectrophoresis (CIEP) by the method of Holland & col. (6) and agar gel diffusion tests according to the C.D.C. Laboratory Techniques for the detection of HBsAg described in detail (9) using standard subtypes sera kindly provided by N.I.H. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, U.S.A and W.H.O. American Red Cross Blood Research Laboratory, Bethesda, Maryland, U.S.A.

The monospecific sera used for CIEP test were prepared as follows: the anti-w serum was prepared using rabbit anti-adw serum carried on affinity chromatography column of Sepharose-4B linked to HBsAg/adr. The anti-d was obtained by absorption of immune sera to HBsAg/adr with HBsAg/ayw. The monospecific anti-y, anti-r and HBsAg standard subtypes were also provided by Dr. Mayumi from Tokyo, Japan.

Results

195 sera of white individuals were analysed and the prevalence of 2.05% of HBsAg and 7.69% of HBsAb were found. From 193 sera of asiatic individuals, there was a prevalence of 4.14% of HBsAg and 7.77% of HBsAb. Both populations included adults and children in school age, and also were divided into urban and rural areas. The prevalence of antigen and antibody in each group is shown in Table 1.

The frequency of HBsAg in asiatic population was higher than the frequency observed in white population ($\alpha = 0.05$). HBsAb showed the same proportion in children as in adults,

Table 1 — Frequency of HBsAb in white and asiatic populations

| | White population | | | Asiatic population | | |
|-------------------|------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|--------------|
| | Total | HBsAg % | HBsAb % | Total | HBsAg % | HBsAb % |
| school age adults | 78 117 | 2.56 1.70 | 7.69 7.69 | 67 126 | 4.47 3.90 | 4.47 9.52 |
| Total | 195 | 2.05 | 7.69 | 193 | 4.14 | 7.77 |
| | | | | | | |
| | White population | | | Asiatic population | | |
| | Total | HBsAg % | HBsAb % | Total | HBsAg % | HBsAb % |
| urban | 135 | 2.56 | 3.81 | 125 | 4.00 | 8.00 |
| rural | 64 | 1.56 | 15.62 | 68 | 4.41 | 7.35 |

whereas in asiatic adults, the frequency of antibody was higher than in school age children (Fig. 1a, Fig. 1b).

The frequency of HBsAg was higher and constant in Japanese population (urban and rural) when compared with white populations from the same regions. There was also a constant prevalence of antibodies in both areas of Japanese population. However, the rural population of white people, showed a higher prevalence of antibodies than urban population (Fig. 1c, Fig. 1d).

Fig. 1 — Frequency of HBsAg and HBsAb in white and asiatic populations. 1a. HBsAg in adults and children; 1b. HBsAb in adults and children; 1c. HBsAg in urban and rural areas; 1d. HBsAb in urban and rural areas

Fig. 1a

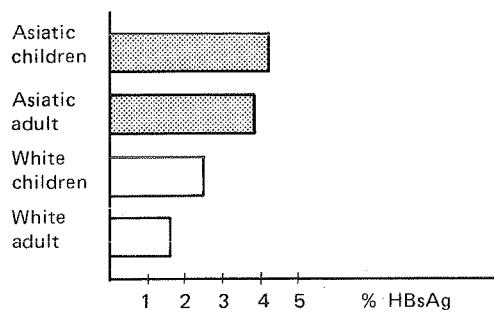


Fig. 1b

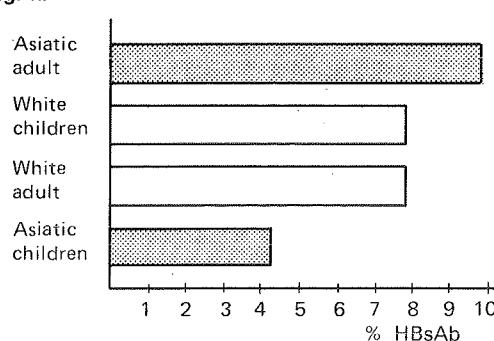


Fig. 1c

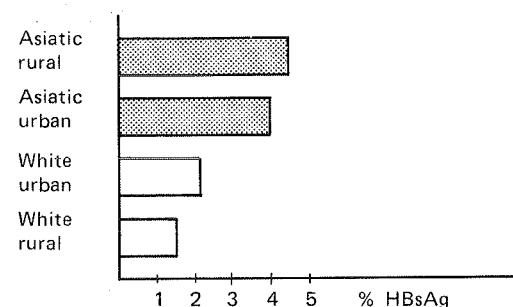
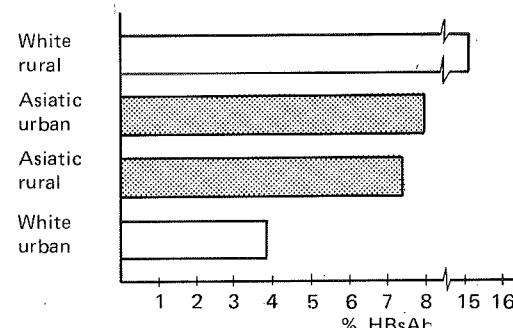


Fig. 1d



All results were statistically significant.

Table 2 shows the association between living area and age (children or adults) of both populations. The frequency of HBsAg showed some variation, but the frequency of HBsAb was higher in adults than in children except in rural children that also showed a high frequency of HBsAb (15.15%).

Table 2 — Frequency of HBsAg and HBsAb in urban and rural areas in white and asiatic populations

| | White population | | Asiatic population | | | |
|--------------|------------------|---------|--------------------|---------|------|-------|
| | Total | HBsAg % | Total | HBsAg % | | |
| urban adults | 86 | 1.16 | 4.65 | 88 | 4.54 | 9.09 |
| school age | 45 | 4.44 | 2.22 | 37 | 2.70 | 5.40 |
| rural adults | 31 | 3.22 | 18.75 | 38 | 2.63 | 10.52 |
| school age | 33 | — | 15.15 | 30 | 6.66 | 3.33 |

The association of adults urban individuals of both populations with their occupation is shown in Table 3. There was a markedly increase of frequency of HBsAg in Japanese population working in hospital (8.10%) and in University students (1.96%), while in white individuals 2.22% of hospital workers were carriers and no case was found in University students. The prevalence of HBsAb in hospital staff members was not higher as expected.

Table 3 — Frequency of HBsAg and HBsAb in adult urban population in white and asiatic population

| | Total | White population | |
|---------------------|-------|--------------------|------------|
| | | HBsAg % | HBsAb % |
| Hospital staff | 45 | 2.22 | 6.66 |
| University students | 41 | | 2.43 |
| | Total | Asiatic population | |
| | | HBsAg % | HBsAb % |
| Hospital staff | 37 | 8.10 | 5.40 |
| University students | 51 | 1.96 | 11.76 |

All positive sera for HBsAg were subtyped using CIEP and confirmed by agar gel diffusion test; 4 sera had low RPHA titer and could not be subtyped. The results are shown in Table 4.

Table 4 — Subtypes in white and asiatic populations

| | White population | Asiatic population |
|----------------|----------------------------------|----------------------------------|
| adw | none | 1 urban, adult 1 rural, child |
| ayw | 1 urban, child 1 rural, child | 1 rural, adult |
| adr | none | 1 urban, child 1 rural, child |
| ayr | none | none |
| not determined | 1 urban, child | 3 urban, adult |

Discussion

HBsAg carriers incidence of 2.05% found in white population studied supports data showing a greater incidence in tropical and subtropical areas (14, 15). The presence of HBsAg carriers in asiatic population was 4.14%, which is 2.01 times higher than white population. The high prevalence in asiatic population has been previously reported by several authors (11, 15).

The proportion of asymptomatic carriers was constantly high in asiatic population and lower in white population, with no relation to age and

living area, suggesting that it may be more associated with genetic effects than with environmental and behavioral factors, although these could not be excluded.

In populations of high incidence of HBsAg, transmission occurs early in childhood, while in populations of low prevalence, carriers appear at higher ages, mainly in adolescents (15). Studying the school children population, we have noted a high frequency of carriers in some populations (Table 2), but in 258 school children studied in the same condition in São Paulo, no case of positivity was found when used CIEP for detection of HBsAg (12).

The data of Cherubin & col. (4), in the study of populations of different ethnicities conducted in New York City, showed that the prevalence of antibody among children and adolescents in all groups was about half of the prevalence among adults. Although their study does not include asiatic individuals, the high levels of antibodies that we found in these two adults populations (Table 2) could be explained by the above data (4).

The levels found in rural population may be explained by local natural conditions or habits, such as improper use of syringes and needles or by the possible occurrence in the past of an outbreak of hepatitis in this population.

Studies comparing the frequency of HBsAg and HBsAb in hospital and non-hospital personnel showed that both history of hepatitis and presence of hepatitis B antibodies were more common among health-care personnel (10). We found a high antigenemia but not a high frequency of HBsAb in hospital workers. Among these, the Japanese population showed a antigenemia 3.64 times higher than white population, suggesting more susceptibility to acquire infection when submitted to the same risk factors.

In spite of the small number of HBsAg samples used for subtyping, it seems that the frequency of ayw in white population suggests the presence of this subtype in the community, while studies carried out in other cities in Brazil show a greater prevalence of adw subtype (3). On the other side, in the asiatic population, besides the most common subtypes (adw and ayw) the finding in two children of adr subtype, not frequent in Brazil, suggests intrafamilial infection (16). Also suggests that HBsAg carriers are more related to their origin country than to their country of residence (5), since 75% of carriers in Japan are of adr subtype (17).

References

1. Antonácio, F. — Antígeno Austrália em doadores de sangue. São Paulo, Faculdade de Medicina da USP, 1972. (Tese).
2. Bensabath, G. & Boshell, J. — Presença de antígeno "Austrália" (Au) em populações do interior do estado do Amazonas, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 15:284-288, 1973.
3. Candeias, L.A.N.; Antonácio, F.; Sette Jr, H. & Silva, L.C. — Occurrence of hepatitis-associated-antigen (HAA) subdeterminants ad and ay in blood donors, acute and chronic liver disease. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 16:226-231, 1974.
4. Cherubin, R.E.; Szmuness, W.; Harley, E.J.; Much M.I. & Roldman, E. — Evidence of hepatitis B infection in hospitalized children in New York City. J. Pediat., 88:893-894, 1976.
5. Feinman, S.V.; Berris, B. & Sinclair, J.C. — Relation of hepatitis B antigen subtypes in symptom-free and carriers to geographical origin and liver abnormalities. The Lancet, 7834:867-869, 1973.
6. Holland, P.V.; Purcell, R.H.; Smith, H. & Alter, H.J. — Subtyping of hepatitis associated antigen (HBsAg): simplified technique using counterelectrophoresis. J. Immunol., 109:420-425, 1972.
7. Imai, M.; Yamashita, Y.; Ozawa N.; Takahashi K.; Saito K. & Mayumi, M. — Methodology for HBsAg and HBsAb detection by R-PHA and PHA assay. Medical Technology, 3:239-244, 1974.
8. Imai, M.; Yamashita Y.; Miyakawa Y. & Mayumi, M. — Hemagglutination inhibition assay of the common determinants and subspecificities of Australia antigen. Immunology, 27:871-878, 1974.
9. Laboratory Techniques for the Detection of Hepatitis B Surface Antigen. Procedural Guide, Immunological Series n.º 9, HEW Publication N.º (CDC) 78:8353, 1977.
10. Lewis, T.L.; Alter H.J.; Chalmers T.C.; Holland P.V.; Purcell R.H.; Lee L.S.; Alling D.W.; Young, D. & Lawson M. — A comparison of the frequency of Hepatitis B antigen and antibody in hospital and nonhospital personnel. N. Engl. J. Med.; 289:647-651, 1973.
11. Okochi K.; Mayumi M.; Haguino Y. & Saito N. — Evaluation of frequency of Australia Antigen in blood donors in Tokyo by means of immune adherence hemagglutination technique. Vox. Sang., 19:332-337, 1970.
12. Oselka G.M. & Kiss, M.H.B. — Estudo sobre a prevalência do antígeno da Hepatite B (AgHB) em crianças, em São Paulo. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. (São Paulo), 33:149-157, 1978.
13. Pereira, J.M. & Callado, A.N.A. — Antígeno Austrália: pesquisa em doadores de sangue do Estado da Guanabara. B. Inst. Est. Hematol. Arthur de Siqueira Cavalcanti (Rio de Janeiro), 2:5-29, 1972.
14. Prince, A.M. — Prevalence of serum hepatitis-related antigen (SH) in different geographic regions. Am. J. Trop. Med. Hyg., 19:872-879, 1970.
15. Szumuness, W. — Recent advances in the study of the epidemiology of Hepatitis B. Am. J. Pathol., 81:629-650, 1975.
16. Szumuness, W.; Harley, E.J. & Prince A.M. — Intrafamilial spread of asymptomatic hepatitis B. Am. J. Med. Sci., 270:293-303, 1975.
17. Yamashita Y.; Kurashina, S.; Miyakawa Y. & Mayumi, M. — South to North gradient in distribution of r determinant of hepatitis B surface antigen in Japan. J. Infect. Dis., 131:567-569, 1975.

Coagglutination method for identification of *Vibrio cholerae**

João R.C. Andrade
 & Yara C.M. Macedo Soares

Summary

The classical diagnosis of cholera rests on quite complex bacteriological procedures which demand significant resources. Many rapid methods have been tested (immunofluorescence, dark field microscopy), all with limited success because they need sophisticated equipment, trained personnel and constant technical support. Aiming to overcome these inconveniences, we developed a rapid slide agglutination technique for *V. cholerae* (coagglutination) which employs a strain of *Staphylococcus aureus* rich in protein A to which immunoglobulin from a polyclonal 0-1 antiserum has been absorbed. By this technique it was possible to characterize vibrio colonies grown in selective media (TCBS agar or Alkaline Nutrient Agar), without the interference of the factors that make the serological agglutination from TCBS by conventional techniques unadvisable. We also evaluated the use of the coagglutination technique for the presumptive diagnosis of cholera when performed directly with enrichment media (alkaline peptone water and tellurite-taurocholate peptone water), by analysing the sensitivity threshold and other variable factors which interfere with technique. With tellurite-taurocholate peptone water, under conditions similar to those found in carriers shedding 10^2 to 10^5 vibrios per gram of stool, a presumptive diagnosis was obtained starting from the 28th to the 32nd hour of incubation at 37°C . Under conditions similar to clinical cases (10^6 to 10^9 vibrios per milliliter of stool) the diagnosis was obtained after 12 to 20 hours of incubation. In all cases, the earliest results were obtained with static incubation conditions, the coagglutination being performed from a fragment of the superficial pellicle.

Resumo

Emprego do método de coaglutinação para identificação presuntiva de Vibrio cholerae

O diagnóstico clássico da cólera repousa em procedimentos bacteriológicos de certa complexidade, que demandam recursos significativos. Têm sido igualmente tentados métodos rápidos (como imunofluorescência, microscopia de campo escuro) com sucesso limitado, por necessitarem de aparelhagem sofisticada, pessoal habilitado e suporte técnico constante. Visando superar tais inconvenientes, desenvolvemos técnica rápida de aglutinação em lâmina para *V. cholerae* (coaglutinação), usando cepa de *Staphylococcus aureus* portadora de proteína A, à qual adsorvemos imunoglobulinas de antisoro polivalente 0-1. Com esta técnica, foi possível caracterizar colônias de vibrião, crescidas em meios seletivos (TCBS Agar e Agar Nutriente Alcalino), sem interferência de fatores que tornam desaconselhável a soroaglutinação convencional, a partir de TCBS. Também avaliamos o emprego da coaglutinação, para o diagnóstico presuntivo do cólera, diretamente de meios de enriquecimento (água peptonada alcalina e água peptonada alcalina-telurito-taurocolato), analisando o limiar de sensibilidade e outras variáveis que interferem na técnica. Em água peptonada telurito-taurocolato, em condições semelhantes à encontrada em portadores excretando 10^2 – 10^5 vibriões/grama de fezes, obtínhamos o diagnóstico presuntivo a partir da 28^a-32^a hora de incubação a 37°C . Partindo de condições semelhantes a casos clínicos (10^6 – 10^9 vibriões/ml de fezes) o diagnóstico era obtido em 12-20 horas de incubação. Em todos os casos, resultados mais precoces foram obtidos com incubação em condições estáticas, fazendo-se a coaglutinação a partir de fragmentos da película superficial.

* Work performed at the Department of Microbiology and Immunology of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
 Rua Teodoro da Silva nº 48, 20000 Rio de Janeiro, Brasil. Supported by grants 21265/78 and 2274/78 from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Introduction

The procedures currently employed for the bacteriological diagnosis of cholera are subject to a somewhat complex laboratory routine and for that very reason are morose and onerous (1).

Inasmuch as the regions where this disease finds a favorable environment for its development usually do not have sophisticated technical resources available (11, 16), simplification and shortening of the usual bacteriological procedures (11, 18), as well as the use of rapid diagnostic methods such as immunofluorescence, and dark field examination for the motility of vibrios (9), have been tried.

Although slide agglutination tests with *Vibrio cholerae* performed directly with growth obtained from selective media permit a rapid presumptive diagnosis, these procedures are not formally recommended because of the possible occurrence of false reactions due to blocking of the agglutination or spontaneous agglutination of the colony being tested (8). When using highly selective media, the appearance of suspect colonies implies their transfer to biochemical screening media and suitable media for serological studies, and, consequently there is a delay in the identification of the germ (18).

On the other hand, detection of asymptomatic cases, where shedding of the organisms is intermittent and in small numbers, has been shown to be very poor when the usual procedures are employed. Healthy carriers play an important role in the dissemination of the disease, particularly in the current cholera pandemic caused by *V. cholerae*, El Tor biotype, which is characterized by a greater incidence of mild cases and of carriers (1, 8, 13).

In the bacteriological diagnosis of microorganisms presenting particularities which render slide agglutination tests inexpedient or impracticable, as occurs with *Neisseria gonorrhoeae* (14), *Streptococcus pyogenes* (4), and *Neisseria meningitidis* (Andrade J. R. C.; Borges Neto, A. A. & Suassuna, I. — Experiência prévia na utilização da técnica de coaglutinação para grupagem sorológica de meningocos. Porto Alegre, Resumos do VII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1976) the use of a serological method called coagglutination has proven to be extremely useful, simplifying the serological characterization on these microorganisms.

Coagglutination is a simple and rapid immunological technique which is based on proper-

ties shown by strains of *Staphylococcus aureus* rich in protein A, component of the cell wall, and by which they absorb immunoglobulins of the IgG class from the diagnostic sera. The absorption is mediated by portions of Fc fragment of the immunoglobulin molecule in such a way that the two Fab fragments, whose extremities are responsible for antigenic specificity, remain free. The staphylococcal cells so sensitized agglutinate on contact with the antigen, forming macroscopic clumps (15).

Coagglutination is, therefore, a result of the interaction between the antigen to be tested and its respective antibody (IgG) absorbed to the surface of *Staphylococcus aureus* rich in protein A (10).

Based on previous experience with coagglutination, a method was developed for the presumptive diagnosis of clinical and asymptomatic cases of cholera, starting from the selective media usually employed for the preliminary isolation of *V. cholera* and from enrichment media used for the diagnosis of carriers. In any of these situations, the technique proposed is based on the coagglutination of cholera vibrios with *Staphylococcus aureus* cells covered with specific antibodies absorbed to protein A.

Material and Methods

Bacterial strains — The four specimens of *V. cholera*, Inaba and Ogawa serotypes, El Tor and classical biotypes were kindly furnished by Dr. Ernesto Hofer of the Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

The *Staphylococcus aureus* 6110 strain, rich in protein A, was obtained from clinical material submitted to bacteriological testing by this Department.

Also employed were specimens of enteric bacteria isolated from clinical material: *Salmonella enteritidis*, 1; *Shigella flexneri*, 1; *Escherichia coli* 0111:B4, 1; *Aeromonas* sp, 1; *Pseudomonas aeruginosa*, 3; and gram negative oxidative rods, 5.

Besides these organisms, 38 bacterial colonies obtained from stool cultures plated in taurocholate citrate-bile salts agar (TCBS) and alkaline nutrient agar (ANA) were tested.

Culture media — For growth of staphylococci, tripticase soy broth (TSB) BBL, was employed; preparation was in accordance with the manufacturer's directions.

For growth of the *V. cholera* strains, nutrient broth or agar supplemented with glucose were employed with the following composition: Bacto-peptone (Difco) 10.0g; Beef extract (Difco) 3.0g; D-glucose (Merck) 2.5g; Sodium-chloride 5.0g; Distilled water, q.s.p. 1 liter. Final pH 7.2 - 7.4.

The nutrient agar with glucose was made by adding 1.5% Bacto-agar (Difco).

In order to standardize the inocula, Mueller-Hinton agar (Difco) was employed for counting viables.

The enrichment media employed in tests for growth of *V. cholerae* were taurocholate-citrate-bile salts agar (TCBS), BBL, and alkaline nutrient agar (ANA), prepared according to Barua (1). The enrichment media employed in with the vibrio were alkaline peptone water (APA) and tellurite-taurocholate alkaline peptone wa-ter (APTT) prepared according to Hofer (12).

Culture and stabilization of staphylococci — The *Staphylococcus aureus* 6110 strain was cultured and stabilized according to Edwards & Hildebrand (5) with some modifications. Overnight growth in TSB, incubated at 37°C with continuous agitation and aeration, was washed twice in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 resuspended in PBS with 0.5% (v/v) formaldehyde and left at room temperature for three hours after which it was washed four times in PBS and incubated at 80°C (in a water bath) for 20 minutes. After these proce-dures, the sediment was again washed twice in PBS and resuspended in PBS with 0.1% sodium azide (Carlo Erba) (v/v) in order to obtain a 10% concentration (v/v).

Coating of the staphylococci — Coating the stabilized staphylococci with specific antibodies followed the procedures described by Kronwall (14). One ml of a 10% suspension of staphylococci stabilized in PBS is added to 0.1 ml of polyvalent *V. cholerae* antiserum, mixed and left at 37°C for three hours with occasional agitation. The mixture is washed and the sediment is resuspended in PBS with 0.1% sodium azide, in order to obtain 1% or 0.5% concentrations. Refrigerate at 4°C.

Standardization of the *V. cholerae* inocula — The strain was inoculated in nutrient glucose broth and incubated at 37°C for a 12 to 18 hour period and afterwards inoculated in Roux bottles containing 150ml of nutrient glucose agar. The overnight growth obtained after incubation

at 37°C was suspended in saline and washed. The sediment was resuspended in saline and its density evaluated by spectrophotometry (Spe-kol ER-1, aus Jena) adjusted to a transmittancy of 4 percent with a wavelenght of 450nm.

The suspension, therefore, has approximately 10^{10} viable bacteria per milliliter. With serial dilutions in saline in 1:10 proportions, bacterial suspensions are obtained in which the viable count is between 10^0 and 10^1 bacteria per milliliter.

Counting of viables was performed by tripli-cate pour-plating with 25ml of Mueller-Hinton agar (Difco) inoculated with 0.1ml of the dilution corresponding to 10^{-8} . The number of via-ble bacteria was determined by counting the number of colonies that grew on each plate and calculating the mean value that is then multiplied by the corresponding dilution:

Coagglutination of *V. cholerae* from selective media — The samples of *V. cholerae* were streaked on TCBS and ANA selective media in order to obtain isolated colonies.

In order to detect a possible false diagnosis, pure cultures of enterobacteria and oxidative gram negative rods, as well as samples for stool cultures from a University Hospital located in a disease-free area were streaked in the same way and on the same selective media described above.

All the plates were incubated at 37°C for 18 to 20 hours and 10 colonies from each were tested.

The tests were perfomed on glass slides and one colony was emulsified in a drop (0.05ml) of a 0.5% suspension of sensitized staphylococci and agitated for 5 minutes at 180 rpm on a circular agitator (Yankee Rotator, Clay Adams Inc.). The reactions were observed by a neon light against a dark background and the results were evaluated according to the following stan-dards:

- 4 + clear liquid with large clumps
- 3 + clear liquid with medium sized clumps
- 2 + slightly opaque liquid with small clumps
- opaque liquid with clumps resembling dust

Simultaneous control tests were performed in order to observe possible spontaneous ag-glutination of the samples or of the 0.5% sus-pension of sensitized staphylococci. The first was performed by emulsifying a colony in a drop (0.05ml) of saline and the second, by de-positing a drop of the 0.5% suspension of sen-

sitized staphylococci, without adding the antigen.

Coagglutination of V. cholerae from enrichment media — The samples of *V. cholerae* were inoculated into tubes (18 × 180mm) and bottles (250ml capacity) containing respectively, 10ml and 50ml of APA or APTT media (1, 12).

The inocula of *V. cholerae* were made by adding one ml of the bacterial suspension, with a known number of viabiles, to enrichment media. In this way it was possible to know the approximate number of viable cells introduced into the enrichment media.

The majority of the assays employed suspensions with concentrations ranging from 10^2 to 10^5 viable bacteria per milliliter, and in all assays the procedures were performed in triplicate.

In an attempt to simulate, in an experimental situation, that found in the detection of carriers, tubes and bottles with APA or APTT were inoculated with 0.1g and 1g respectively, of recently emitted stool, obtained from a minimum of three individuals in whom the use of antimicrobials was controlled. These tubes and bottles were thoroughly agitated before they were inoculated with *V. cholerae*, and incubated at 37°C under static conditions or with occasional agitation.

The coagglutination tests were performed on glass slide by placing one drop (0.05ml) of the enrichment media after agitating the tubes or bottles or by mixing in one drop (0.05 ml) of saline, a loopfull of the pellicle of the growth on the surface of the APA or APTT media incubated under static conditions. A drop (0.05ml) of a 1% suspension of the sensitized staphylococci was then added and the slide was agitated

on the circular agitator for 10 minutes.

The reactions were observed by neon light against a dark background and the results were evaluated by the following standards:

- + large and numerous clumps spread about the entire extension of the drop, slightly opaque liquid.
 - (+) opaque liquid with small, delicate clumps spread throughout the drop
 - absence of clumps, occasional appearance of gross, isolated particles, very cloudy liquid.

Controls were performed for each assay in order to verify the presence of spontaneous agglutinin of the enrichment media or of the 1% suspension of staphylococci and consisted of placing one drop of APA or APTT medium with or without addition of stool and one drop of the suspension of staphylococci, separately and without adding any other material, on glass slides which were agitated for 10 minutes.

Results

The coagglutination technique was performed with *V. cholerae* colonies isolated from ANA and TCBS selective media. The results obtained are listed in Tables 1 and 2.

The tests performed with the other bacteria grown on ANA and/or TCBS did not show any kind of reaction with the 0.5% suspension of sensitized staphylococci.

Table 3 expresses the variation in intensity of the coagglutination reaction with saline suspensions with known counts of *V. cholerae*, submitted or not to heating. There is no significant alteration in the vibrio's reactivity after heating (100°C, 1 hour).

Table 1 — Intensity of the coagglutination of *V. cholerae* colonies grown in TCBS agar

| Bacterial strains | Colonies tested | | | | | | | | | |
|------------------------------------|-----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <i>V. cholerae</i> Ogawa El tor | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| <i>V. cholerae</i> Ogawa classical | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ |
| <i>V. cholerae</i> Inaba El tor | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ |
| <i>V. cholerae</i> Inaba classical | 4+ | 3+ | 4+ | 4+ | 3+ | 4+ | 4+ | 4+ | 3+ | 4+ |

Table 2 — Intensity of the coagglutination of *V. cholerae* colonies grown in ANA agar

Table 3 — Variation in the intensity of the coagglutination reaction with known suspensions of *V. cholerae* submitted or not to heating

| Suspensions(*) | <i>V. cholerae</i> Ogawa El tor | | <i>V. cholerae</i> Inaba El tor | |
|-----------------------------------|---------------------------------|------------|---------------------------------|--------|
| | live | heated(**) | live | heated |
| 10 ¹ – 10 ⁷ | – | – | – | – |
| 10 ⁸ | (+) | (+) | – | – |
| 10 ⁹ | + | + | + | + |
| 10 ¹⁰ | + | + | + | + |

(*) number of viable bacteria per milliliter of saline solution

(**) heating at 100°C, for one hour

Table 4 — Evaluation of reactivity of coagglutination for standardized suspensions of *V. cholerae*, in APTT with stool added

| Suspensions(*) | Specimens evaluated | | | |
|-----------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| | <i>V. cholerae</i> Ogawa El tor | <i>V. cholerae</i> Ogawa classical | <i>V. cholerae</i> Inaba El tor | <i>V. cholerae</i> Inaba classical |
| 10 ¹ – 10 ⁸ | – | – | – | – |
| 10 ⁹ | + | + | + | (+) |

(*) in APTT tubes containing 0,1g of stool

The variation in reactivity of standard suspensions of *V. cholerae* in tubes containing APTT, to which 0.1g of stool has been added, permits one to verify, according to Tables 3 and 4, that the number of bacteria per milliliter necessary for sharp reactions to occur is high and that the culture medium, containing inhibitory substances such as tellurite and, above all, stool, does not hinder the coagglutination reaction although there is a decrease in the reactivity when compared to the test performed with saline suspensions of vibrios without added stool (Table 3).

Table 5 presents the results for coagglutination reactions after incubating *V. cholerae* in tubes containing APA and APTT with the addition of stool. These tables suggest that a delay in growth occurs when the vibrio is inoculated in APTT, and a level compatible with a positive reaction, even after 24 hours incubation, is not reached, the same not occurring with APA under these conditions. The number of vibrios in the inocula employed (10² and 10⁵ viable bacteria per tube) correspond to the values (minimum and maximum) admitted by Barua (1) for one gram of stool when dealing with carriers.

Table 6 presents the results obtained for the coagglutination reactions of *V. cholerae* Ogawa El Tor incubated in bottles with 50 ml of APA

and APTT, and 1g of stool added and inoculated with quantities considered limiting for shedding in carriers.

Table 5 — Coagglutination reactions after incubating *V. cholerae* Ogawa El tor and *V. cholerae* Inaba El tor tubes containing APA and APTT, without addition of stool

| Incubation time (hours) | APA | | APTT | |
|-------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | (*)10 ² | 10 ⁵ | 10 ² | 10 ⁵ |
| 2 | – | – | – | – |
| 4 | – | – | – | – |
| 6 | – | (+) | – | – |
| 8 | (+) | + | – | – |
| 10 | + | + | – | – |
| 24 | + | + | – | – |

(*) initial numbers of viable bacteria deposited in tubes containing APA and APTT

Table 6 — Coagglutination reactions after incubating *V. cholerae* Ogawa El tor in bottles containing 50ml of APA and APTT, with addition of stool

| Incubation time (hours) | APA | | APTT | |
|-------------------------|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | (*)10 ² | 10 ⁵ | 10 ² | 10 ⁵ |
| 2 – 10 | – | – | – | – |
| 24 – 30 | – | – | – | + |

(*) initial numbers of viable bacteria deposited in the bottles containing APA and APTT

(**) approximately one gram of stool per 50ml of medium

The use of 50ml bottles, the choice of the inocula and the addition of stool (1g) were all done so that the assay conditions would be as close as possible to reality, because, according to Barua (1) and Hofer (12) inoculating 1g of stool in 50ml of an enrichment medium is important for detecting asymptomatic cases, considering that since small quantities of vibrio are shedded, the larger the quantity of material processed, the greater the possibility will be for isolating the germ.

Under these conditions, a complete hindrance of the coagglutination reaction in APA medium occurred, not dependent of the initial inoculum. But, in APTT coagglutination was positive after 24 hours of incubation; indicating a satisfactory multiplication of the vibrio, which reached quantities detectable by this method.

In order to elucidate the performance of the APA medium, the assay was repeated in the following manner: every two hours aliquots from each bottles were streaked on TCBS agar and eosine-methylene blue (EMB) agar (Difco). These procedures were repeated until the 24th hour of incubation. A progressive increase in the vibrios growth was noted in APTT, while in APA a discreet growth was observed together with an increase in the number of enteric bacteria.

Tables 7 and 8 present the coagglutination reactions obtained after inoculating *V. cholerae* El tor and classical *V. cholerae* Ogawa in bottles containing APTT, with addition of stool (**), with and without agitation.

| Incubation time (hours) | Samples tested | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|-----|-----------------|---|------------------------------------|-----|-----------------|-----|
| | <i>V. cholerae</i> Ogawa El tor | | | | <i>V. cholerae</i> Ogawa classical | | | |
| | (*) 10 ² | | 10 ⁵ | | 10 ² | | 10 ⁵ | |
| | P | A | P | A | P | A | P | A |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | (+) | - |
| 28 | - | - | (+) | - | (+) | - | + | (+) |
| 32 | - | - | + | - | - | - | + | (+) |
| 36 | - | - | + | - | + | (+) | + | (+) |
| 48 | (+) | (+) | + | + | + | (+) | + | (+) |

P: superficial pellicle, bottles incubated statically

A: agitated bottles, no visible pellicle

(*) initial numbers of viable bacteria deposited in the bottles

(**) approximately one gram of stool per 50ml of medium

Table 8 — Coagglutination reactions after incubating *V. cholerae* El tor and classical *V. cholerae* Inaba in bottles containing APTT, with addition of stool (**), with and without agitation

| Incubation time (hours) | Samples tested | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|-----|-----------------|-----|------------------------------------|---|-----------------|-----|
| | <i>V. cholerae</i> Inaba El tor | | | | <i>V. cholerae</i> Inaba classical | | | |
| | (*) 10 ² | | 10 ⁵ | | 10 ² | | 10 ⁵ | |
| | P | A | P | A | P | A | P | A |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 28 | - | - | - | - | - | - | (+) | - |
| 32 | - | - | (+) | - | - | - | + | - |
| 36 | - | - | (+) | - | - | - | + | (+) |
| 48 | (+) | (+) | + | (+) | O | O | + | (+) |

P: superficial pellicle, bottles incubated statically

A: agitated bottles, no visible pellicle

O: not performed

(*) initial numbers of viable bacteria deposited in the bottles

(**) approximately one gram of stool per 50ml of medium

In practically all the samples, independent of the initial inoculum the reaction performed with pellicle gave early results (around 28 to 32 hours of incubation) while the sharply positive reactions for bottles submitted to agitation, occurred only after 48 hours of incubation.

Additional assays, which are not presented as tables, indicated that employing tubes with 10ml. of APTT and 0.1g. of stool, when inoculated with 10^2 , 10^3 , 10^4 , and 10^5 vibrios, present sharply positive coagglutination reactions at the end of 24 hours of incubation, whether from pellicles or from agitated material.

Tables 9 and 10 evaluate results for the performance of the coagglutination reactions when clinical cases, where the shedding of *V.*

cholerae can reach 10^6 to 10^{11} vibrios per milliliter of diarrheal stool, are simulated.

Tubes with 10ml of APTT and 0.1g of stool were inoculated with two loopfulls of a saline suspension of vibrios containing 10^6 and 10^9 viable bacteria per milliliter, and aliquots from each tube were tested every four hours starting from the 12th hour until 24 hours of incubation under static conditions or with occasional agitation.

The results obtained were intensely positive after 20 to 24 hours, not considering the incubation conditions, while the detection of positive reactions performed with pellicles was possible after 12 hours of incubation for all samples except classical *V. cholerae* Inaba which became positive after 16 hours.

Table 9 — Coagglutination reactions after incubating *V. cholerae* El tor and classical *V. cholerae* Ogawa, in tubes with APTT, with addition of stool(**), with and without agitation

| Incubation time (hours) | Samples tested | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|-----|--------|---|------------------------------------|-----|--------|-----|--|
| | <i>V. cholerae</i> Ogawa El tor | | | | <i>V. cholerae</i> Ogawa classical | | | | |
| | (*) 10^6 | | 10^9 | | 10^6 | | 10^9 | | |
| | P | A | P | A | P | A | P | A | |
| 12 | (+) | - | + | + | (+) | - | + | (+) | |
| 16 | (+) | - | + | + | (+) | - | + | + | |
| 20 | + | (+) | + | + | + | (+) | + | + | |
| 24 | + | + | + | + | + | + | + | + | |

P: superficial pellicle, bottles incubated statically

A: agitated bottles, no visible pellicle

(*) number of viables per ml of the suspension employed

(**) approximately 0.1 gram of stool per 10ml of medium

Table 10 — Coagglutination reactions after incubating *V. cholerae* El tor and classical *V. cholerae* Inaba in tubes with APTT, with addition of stool(**), with and without agitation

| Incubation time (hours) | Samples tested | | | | | | | | |
|-------------------------|---------------------------------|-----|--------|---|------------------------------------|-----|--------|-----|--|
| | <i>V. cholerae</i> Inaba El tor | | | | <i>V. cholerae</i> Inaba classical | | | | |
| | (*) 10^6 | | 10^9 | | 10^6 | | 10^9 | | |
| | P | A | P | A | P | A | P | A | |
| 12 | (+) | - | + | + | - | - | + | (+) | |
| 16 | (+) | - | + | + | - | - | + | + | |
| 20 | + | (+) | + | + | (+) | - | + | + | |
| 24 | + | + | + | + | + | (+) | + | + | |

P: superficial pellicle, bottles incubated statically

A: agitated tubes, no visible pellicle

(*) number of viables per ml of suspension employed

(**) approximately 0.1 gram of stool per ml of medium

Discussion

Serological agglutination of *V. cholerae*, when employed together with a routine for a presumptive identification of this microorganism, shows a great differential value and practically establishes the diagnosis of this agent, especially when associated with typical screening and oxidase tests (11, 18) or, in many cases directs the choice of colonies to be submitted to identification (7, 11, 18).

Conversely, the use of highly selective media is becoming widespread due to the ease in preparation and exceptional selective and differential activity (7, 11, 18). But a tentative early diagnosis performed by serological agglutination of colonies grown on TCBS is usually not recommended due to the possible occurrence of false results, apparently a consequence of the high concentration of bile salts and sucrose (1, 4, 8).

The use of suspensions of staphylococci sensitized with polyvalent commercial serum for coagglutination of *V. cholerae* colonies grown in ANA and TCBS media disclosed intensely positive reactions for the four strains of *V. cholerae* tested. False reactions due to blocking of the reaction or to spontaneous agglutination of the material were not seen.

The tests performed with the other bacterial samples obtained from pure cultures or stool cultures in ANA and/or TCBS, were uniformly negative, and no false reactions due to alkalization or acidification of the colonies or transfer of medium components to the reaction were seen.

Additional tests performed with old colonies (4-5 days) of *V. cholerae*, showing intense alkalization, did not show any difference in relation to tests performed with recent growths.

Important aspects which interfere with the intensity of coagglutination reactions are the concentration of the sensitized Staphylococcus and the volume of the drop where the reaction is processed. Regarding the first aspect, when 1% and 0.5% concentrations are compared the sharpest reactions occur with the latter concentration. In relation to the last aspect, the volume of the drop was diminished because of the occurrence of small-sized *V. cholerae* colonies which furnish small quantities of antigenic material. For the same reason, the colony was emulsified directly in the suspension of staphylococci in order to avoid further dilution of the material.

Other attempts to obtain a rapid diagnosis for beta-hemolytic streptococci, *Salmonella* and *Shigella* by applying coagglutination techniques directly to colonies grown on the surface of primary isolation plates, have attained equally satisfactory results, although different methodologies are employed (5, 6).

The asymptomatic and carrier cases are difficult to detect due to the small number of bacteria shedded by the individual (10^2 to 10^5 per gram of stool) and to the associate microbiota which can cause significant alterations in the material, including loss of viability of the vibrios (5, 7). The identification of such cases is of extreme importance, the only available procedures being the bacteriological examination of the stool. Other means proposed for control and prevention of epidemics such as vaccination or indiscriminate use of antibiotics have shown to be of doubtful value (8, 13).

With this problem in view, the coagglutination technique was employed directly to enrichment media in an attempt to detect the choleric vibrios quickly and easily, thus permitting a presumptive diagnosis of the agent.

The enrichment media usually employed in the bacteriology of cholera include APA and APTT, media which stand out due to their efficiency and trustworthiness for isolation the germ. These media were employed testing the procedures described in the available literature: approximately 0.1g of stool was inoculated in 10ml of APA or APTT medium distributed in tubes, or 1-2g of stool were inoculated in bottles containing 50ml of medium (1, 12). The tests tried to evaluate, under simulated conditions, the interference of the enrichment media, stool and intestinal bacteria in the development or intensity of the coagglutination reactions.

For these tests, 1% suspensions of staphylococci were employed because this suspension is diluted in equal volumes of medium in order that a final concentration of 0.5% is obtained. The volume of the drop (0.1ml) where the reaction is processed makes the use of a circular agitator necessary in order for the reactions to reach their maximum intensity.

The reaction's threshold for positivity corresponds to an elevated number of vibrio per milliliter, either for saline suspensions of bacteria or for the APTT medium with 0.1g of stool added (Tables 3 and 4). The level compatible with a positive reaction is reached more rapidly with APA than with APTT when stool is not added.

But after adding stool, the APA medium is shown to be deficient in relation to the APTT medium which shows good results.

The procedures performed in order to elucidate this problem furnish similar data to those found in literature. Growth of the intestinal flora after 6 to 8 hours of incubation can overcome the vibrio's proliferation, especially when, as in the case of carriers, a small quantity of vibrio is inoculated together with large quantities of microorganisms belonging to the normal flora. The APTT medium, having a greater inhibitory action, reduces the growth of the associate flora, permitting the vibrio to proliferate satisfactorily, although it takes a greater length of time to do so(1).

Regarding the tests performed in situations similar to those found in carriers, the results obtained for the samples of *V. cholerae* inoculated into bottles containing 50ml of APTT and 1g of stool, incubated with or without agitation, demonstrated that sharp positive reactions in the media which are static are found earlier in material from superficial pellicles, whereas media incubated with agitation show sharply positive reactions only after 48 hours (Tables 7 and 8).

This pellicle-forming tendency shown by *V. cholerae* on the surface of liquid media may be used to advantage in the classical bacteriology of cholera in order to perform subculture from primary enrichment media (12).

The use of tubes containing 10ml of APTT to inoculate clinical specimens from carriers, permits the vibrios to be detected after 24 hours of incubation, either from agitated tubes or from pellicles. In our opinion this is due not only to the smaller quantity of stool introduced (0.1g) but also to the smaller total volume of medium (10ml), thus permitting the vibrio population to reach more rapidly a number of bacteria per milliliter sufficient for a positive coagglutination. It is true that a smaller quantity of stool can diminish the initial number of vibrios introduced into the system, thus limiting the efficiency of this procedure, especially when dealing with carriers shedding very small quantities of vibrios.

The results of the tests performed in situations similar to those found in clinical cases show that the coagglutination technique is capable of detecting the vibrio present in material taken from pellicles which have been incubated for 12 hours and positive results, from tubes incubated with agitation, are observed after 24 hours of incubation.

Some limiting aspects for the serological diagnosis of *V. cholerae* must be remembered: (a) strains of *V. cholerae* which have envelope antigens do not react with polyvalent serum unless the vibrios are heated at 100°C for one hour; (b) "rough" strains which do not have group antigens (somatic), usually associated with carriers, do not agglutinate with polyvalent serum and sometimes show spontaneous agglutination in saline; (c) some members of the *Vibrio* genus, similar to choleric vibrios, including their pathogenic potential, do not agglutinate in polyvalent serum even after heating.

Such restrictions for the absolute value of the serological diagnosis of *V. cholerae* could be equally extended to the coagglutination test. But in our view, they should not threaten significantly the perspectives for applying this technique, not only because of the limited frequency with which it occurs but also because of the possibilities of employing some alternatives such as the concurrent use of staphylococci sensitized with antiserum against "rough" strains(1) or heating suspensions of colonies grown in TCBS and/or ANA, to perform the coagglutination reactions.

Concerning the use of coagglutination for the serological characterization of colonies grown in selective media, this procedure would give greater assurance to the quick bacteriological routines employed in areas with scant resources, or reduce the time necessary for identifying the agent when coupled to bacteriological routines employed in laboratories with greater facilities.

Coagglutination can make a valuable contribution to the presumptive diagnosis of carrier and clinical cases because it shows distinct advantages over other techniques such as dark field microscopy, vibrio immobilization tests or immunofluorescence, not requiring complex equipment, trained personnel or special fittings, its execution being possible in areas lacking these facilities. Based on the data obtained, it seems valid to suggest that for each specimen submitted for examination, a 10ml tube and a 50ml bottle containing APTT should be inoculated with 0.1g and 1.0g of stool respectively and incubated under static conditions. Coagglutination should be preferentially sought for from the pellicle formed on the surface of the media between the 12th and 28th hour of incubation.

References

1. Barua, D. — Laboratory diagnosis of cholera. In: — Barua, D. & Burrows, W., eds. — Cholera. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1974.
2. Christensen, P.; Kalmeter, G.; Jonsson, S. & Kronvall, G. — New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. Infect. Immun., 7:881-885, 1973.
3. Danielsson, D. & Kronvall, G. — Slide agglutination method for the serological identification of *Neisseria gonorrhoeae* with anti-gonococcal antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. Appl. Microbiol., 27:368-374, 1974.
4. Dewitt, W.E. — Isolamento de *V. cholerae*. In: — Costa, G.A. — Meios de cultura, provas bioquímicas e métodos sorológicos usados no isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, 1971.
5. Edwards, E.A. & Hilderbrand, R.L. — Method for identifying *Salmonella* and *Shigella* directly from the primary isolation plate by coagglutinin of protein A-containing staphylococci sensitized with specific antibody. J. Clin. Microbiol., 3:339-343, 1976.
6. Edwards, E.A. & Larson, G.L. — New method of grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized protein A-containing staphylococci. Appl. Microbiol., 28:972-976, 1974.
7. Ewing, W.H.; Davis, B.R. & Martin, W.J. — Outline of methods for the isolation and identification of *Vibrio cholerae*. Atlanta, Public Health Service, C.D.C., 1966.
8. Feeley, J.C. & Balows, A. — *Vibrio*. In: — Lenette, E.H. & Truant, J.P., eds. — Manual of clinical microbiology. 2nd edition. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974.
9. Finkelstein, R.A. & Gomez, C.Z. — Comparison of methods for the rapid recognition of cholera vibrios. Bull. W.H.O., 28:327-332, 1963.
10. Forsgren, A. & Sjöquist, J. — Protein A from *Staphylococcus aureus*. I — Pseudo-immune reactions with human γ-globulin. J. Immunol., 97:822-827, 1966.
11. Gangarosa, E.J.; Dewitt, W.E.; Huq, I. & Zarifi, A. — Laboratory methods in cholera: isolation of *Vibrio cholerae* (El tor and classical) on TCBS medium in minimally equipped laboratories. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 62: 693-699, 1968.
12. Hofer, E. — Métodos utilizados para o isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. Informe de Patologia Clínica, 1:5-18, 1975.
13. Kamal, A.M. — Endemicity and epidemicity of cholera. Bull. W.H.O., 28:277-287, 1963.
14. Kronvall, G. — A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A-containing staphylococci. J. Med. Microbiol., 6:187-190, 1973.
15. Kronvall, G. & Williams, R.C. — Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. J. Immunol., 103:828-833, 1969.
16. Monsur, K.A. — Bacteriological diagnosis of cholera under field conditions. Bull. W.H.O., 28:387-389, 1963.
17. Panja, G. — *Vibrio comma (cholerae)*. Gram negative bacilli, vibrios and spirilla. In: — Frankel, S.; Roitman, S. & Sonnerwirth, A.C., eds. — Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis. 6th edition. St. Louis, C.V. Mosby, 1963.
18. Tamura, K.; Shimada, S. & Prescott, L.M. — Vibrio agar: a new plating medium for isolation of *Vibrio cholerae*. J. Med. Sci. Biol. (Japan), 24: 125-127, 1971.

**Estudo da população bacteriana
de amostras de lodo colhidas
no digestor da Estação de Tratamento
de Esgotos de Pinheiros
(SABESP) — Contagem de bactérias
anaeróbias e facultativas do
lodo em digestão anaeróbia**

Rosana E. Gregori*
 Claudio C. Lombardi*
 Eloisa F. Ferreira*
 Luiz C. Raphaelli
 & Susana Berthold**

Resumo

Procedeu-se à contagem de bactérias anaeróbias e facultativas, em amostras de lodo de esgoto, colhidas no período de 21 de junho de 1977 a 23 de junho de 1978. Os resultados apresentados levam-nos a crer que, apesar das perturbações às quais está submetido o sistema, do ponto de vista da concentração bacteriana o digestor opera em regime próximo do permanente.

Summary

Study of bacterial population in sludge samples obtained from the Sewage Treatment Plant of Pinheiros, (SABESP). Counting of anaerobic and facultative bacteria in anaerobic digesters

Anaerobic and facultative bacteria were counted in sewage sludge samples collected during the period june 21, 1977 to june 23, 1978.

In spite of the fact that the anaerobic digester is a continuously disturbed system, from the point of view of bacterial concentration the digester operates at an almost steady — state.

A presente nota resume os resultados obtidos em trabalhos, que constituem parte de uma programação, cujo objetivo é estudar a população de bactérias anaeróbias e facultativas existentes no tratamento microbiano anaeróbico de lodo e esgoto. Nesta fase dos trabalhos foram medidas as concentrações de bactérias anaeróbias e facultativas, no período de 21 de junho de 1977 a 23 de junho de 1978, em amostras de lodo em digestão colhidas na ETE — Pinheiros (SABESP).

As amostras foram colhidas, da bomba de homogeneização do digestor nº 2, em frascos de vidro de 250ml sob atmosfera de nitrogênio.

A medida da concentração de bactérias anaeróbias foi realizada pelo método descrito, por Bryant (The A.J. Clin. Nut., 25:1924, 1972).

Na contagem de bactérias facultativas, utilizou-se semeadura em placas de Petri (Standard Methods for the examination of Water and Wastewater, 14.^a ed. 1975).

* Divisão de Pesquisas Microbiológicas, GTB Superintendência de Pesquisas, CETESB, Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345, 05459 São Paulo, SP.

** Centro de Estudos de Fertilizantes, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, S/A, IPT, Cidade Universitária, 05508 São Paulo, SP.

O meio de cultura utilizado na contagem das bactérias aneróbias foi o descrito por Salinitro (Appl. Microbiol., 27:678, 1974). Na determinação de concentração de bactérias facultativas, utilizou-se esse mesmo meio de cultura a menos das soluções indicadoras e redutoras de oxigênio.

A metodologia empregada, no preparo da amostra de lodo de esgoto, foi a seguinte: 5ml da amostra foram transferidas em condições anaeróbias, para um tubo de ensaio (18mm x 150mm) esterilizado e contendo, aproximadamente, 10g de pérolas de vidro; este tubo, fechado com rolha de borracha, foi agitado rigorosamente durante 30 min; as diluições do lodo homogeneizado foram realizadas em atmosfera de CO₂. O tempo de incubação (30 ± 0,5)°C foi de 10 dias para as bactérias não metanogênicas e de 3 dias para bactérias facultativas. A concentração de bactérias foi calculada a partir da contagem de 5 tubos semeados com a mesma diluição.

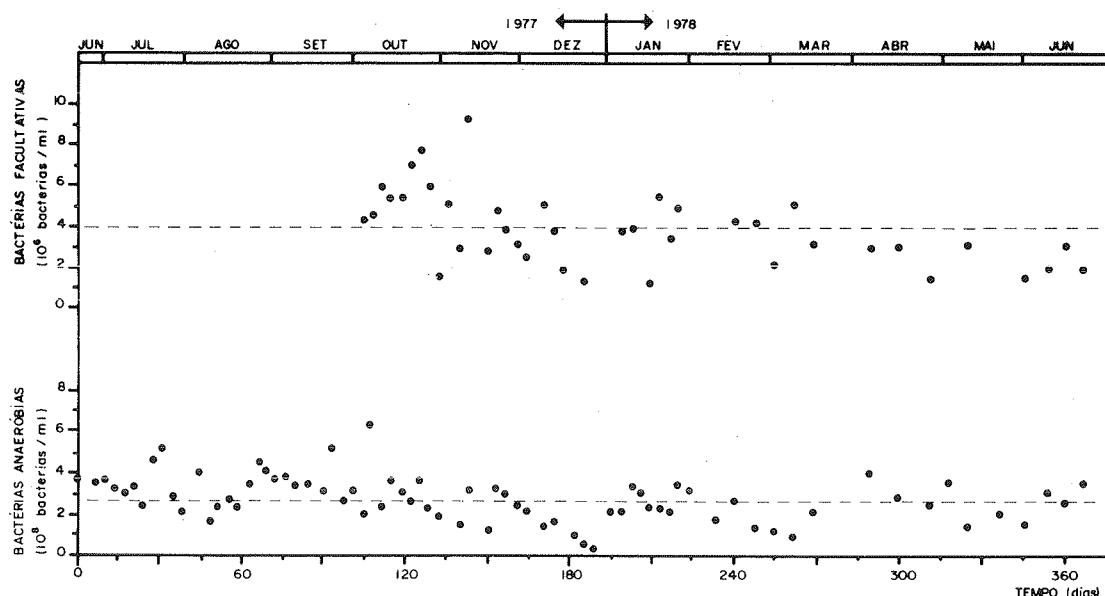
Os resultados obtidos estão representados na Fig. 1. Analisando-se esses resultados, e levando-se em conta erros inerentes à determinação de concentrações bacterianas, verificamos

que, apesar das diferentes condições ambientais e das perturbações às quais está submetido o sistema, não se verificaram consideráveis variações das concentrações bacterianas durante o período observado, no que diz respeito às bactérias anaeróbias e facultativas.

O valor médio encontrado, para as bactérias anaeróbias, foi de $2,7 \times 10^6$ bactérias/ml (desvio padrão = $1,1 \times 10^6$ bactérias/ml), enquanto que no caso das bactérias facultativas foi de $4,7 \times 10^6$ bactérias/ml (desvio padrão = $1,8 \times 10^6$ bactérias/ml). Os resultados apresentados levam-nos a concluir que a grande maioria das bactérias do lodo em digestão pertence ao grupo das bactérias anaeróbias estritas, uma vez que a concentração destas é aproximadamente 57 vezes maior do que a das bactérias facultativas.

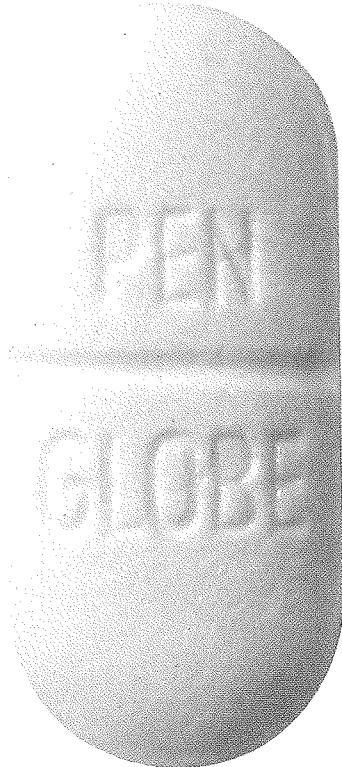
A Figura 1 mostra ainda, de maneira bastante clara, que o digestor funciona em regime próximo do estacionário no que diz respeito às concentrações de bactérias anaeróbias e facultativas, analogamente ao que foi observado com as bactérias aeróbias em trabalho anterior (Rev. DAE — SABESP, 39 (120):73, 1979).

Figura 1 — Contagem de bactérias do lodo em digestão da ETE Pinheiros da SABESP no período de 21 de junho de 1977 a 23 de junho de 1978



Penglobe® bacampicilina

um produto original
de pesquisa Astra



2 vezes mais ampicilina para a bactéria

- Concentrações tissulares superiores
- Eficácia clínica comprovada
- Todo o espectro de ação das ampicilinas

2 vezes menos ampicilina para o paciente

- Menor posologia: apenas 1 administração a cada 12 horas
- Manutenção da flora intestinal
- Utilização integral do princípio ativo
- Muito boa tolerância clínica

Apresentação:

Caixa com 12 comprimidos de 400 mg

Penglobe®
penetração global

A S T R A
Astra Group, Pharmaceutical Division, Sweden

DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS LTDA.



Meios de Cultura, antisoros, disco de sensibilidade,
reagentes diagnósticos, corantes.

SIGMA
Produtos Bioquímicos

TURNER/ESPECTRA
Fotômetros de chama
Espectrofotômetros
Fluorômetros

TRANSIDYNE
Densitômetros

SHERWOOD
Sistema Monoject,
Aguilhas, Paraplast,
Coagulyzer

THE NUCLEUS
Gamma Counters

HARLECO-S/P
Corantes e aparelhos

S & S
Papel de filtro

BARNSTEAD
Água Deionizada Qualidade Reagente.
Ultrapura

F.T.S.
Liofilizadores
Câmaras
Ultrafria

NATIONAL
Urinômetros, refractômetros

PRODUTOS QUÍMICOS
MCB, Pfaltz & Bauer, Aldrich, USB, Humko,
Pierce, Calbiochem, ICN, Baker, Eastman,
INLAB, Fluka.

NUCLEPORE
Membranas filtrantes

PROPPER
Lâminas, laminulas, Pipetas
glób. brancos e vermelhos

CARTER-WALLACE
Kit de toxoplasma e criptococos

HYCEL
Contadores automáticos de células,
Kits superanalizers

DIGIMETRIC
Balanças eletrônicas.

CLAY ADAMS
Contadores de células, Centrifugas

InLAB (Produção própria)
Bacti-Swabs, Uro-Dips, Lancetas,
Capílares, Agulhas, Detergentes

DRUCKER
Centrifugas refrigeradas

OHAUS
Balanças para laboratórios e indústrias

GENERAL DIAGNOSTIC

Soros controle
Tromboplastina cárlica

CULTURETTES

Transporte de amostras
bacteriológicas

B & L (Bausch & Lomb)
Microscopia

OXFORD
Imunodifusão, Pipetadores,
Diluidores, Kits, Cálculo Urinário,
Bicarbonato, Micropipetas.

WELLCOME
Antígenos e antisoros

PFIZER
Antigex-Hepatitis em 4 minutos

GAS PAK
Jarras e componentes

FLOW LABORATORIES
Meios p/ cultura de tecidos, Antígeno
Rubella, Equipamento p/ microtitulação

SWIFT
Microscópios estéreo,
Binocular, Koehler,
de imunofluorescência.

LIVROS TÉCNICOS
Novidades em microbiologia,
imunologia, bioquímica, eletroforese

THERMOLYNE
Agitadores, Muflas, Banhos a seco.

DOLES
Kits bioquímicos

CLINILAB
Centrifugas.

LKB
Gamma e Beta Counters

GILFORD
Espectrofotometria de Precisão.

PHARMACIA FINE CHEMICAL
Produtos para Cromatografia e Separações
Bioquímicas

GELMAN
Eletroforese, Membranas filtrantes

LB (Produção nacional)
Meios de cultura em placa, tubos e frascos,
corantes, reagentes, soluções, padrões.

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Conserto e manutenção de aparelhos para
laboratórios. Peças originais.