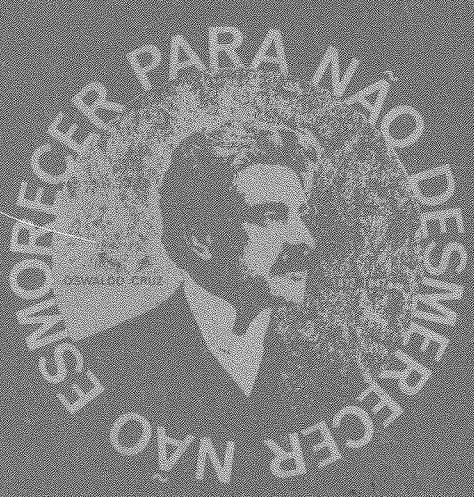


Volume 11 Número 3 Julh.-Set. 1980

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo – Brasil







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\$ 600,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via área) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 150,00 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 agrupar 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 ($m\mu$) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6}m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9}m$), ao invés de milímicro ($m\mu$); e Angstroms (\AA ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro (μl 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 "Berger'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 reticulas 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 11 Julho-Setembro 1980 Número 3

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11 (3)

CONTEÚDO

- | | | | |
|--|----|---|--|
| Maria L. C. Carvalhal
Beatriz Ribas Castellani
& Flávio Alterthum | 71 | <i>Efeito de antibióticos poliênicos sobre Saccharomyces cerevisiae contendo diferentes esteróis e ácidos graxos insaturados incorporados à membrana citoplasmática</i> | <i>The effect of polyene antibiotics was studied on cell suspensions of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> containing different sterols and unsaturated fatty acids incorporated into the plasma membrane</i> |
| José Alberto N. Candeias
Evandro Roberto Baldacci
José Carlos Breviglieri
Maria Lúcia Rácz
& Charlotte Harsi | 76 | <i>Diagnóstico de infecções por rotavírus através da reação de imunofluorescência indireta</i> | <i>The indirect immunofluorescent test in diagnostic of rotavirus infections</i> |
| Fernando Portela Câmara | 79 | <i>A estrutura do vírus Ômega: um fago temperado do <i>Staphylococcus epidermidis</i></i> | <i>The structure of Omega virus: a temperate phage of <i>Staphylococcus epidermidis</i></i> |
| Angela C. Rodrigues
Antonio F. P. de Castro
Marlene Braide Serafim
& Waldir Giorgi | 83 | <i>Identificação sorológica e sensibilidade a drogas de amostras de <i>Pasteurella multocida</i> isoladas em São Paulo</i> | <i>Serological identification and drug sensitivity of <i>Pasteurella multocida</i> strains isolated in São Paulo, Brazil</i> |
| Eva Miranda de Souza
Débora Maria Massa Lima
Maria D. G. Cavalcanti
& Maviael José dos Santos | 89 | <i>Isolamento e estudo de <i>Candida albicans</i> e actinomicetos encontrados na cavidade oral de crianças</i> | <i>Isolation and study of <i>Candida albicans</i> and Actinomycetes in oral cavity</i> |
| Vicente de P. Campos
Daison Olzany Silva
& Murilo G. de Carvalho | 97 | <i>Toxinas fitopatogênicas produzidas in vitro por <i>Helminthosporium maydis</i> isolado no Brasil</i> | <i>Pathotoxins produced in vitro by Brazilian isolates of <i>Helminthosporium maydis</i> Nisikado & Miyake</i> |

CONTENTS

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Intelabor — Importação e Exportação de Artigos para Laboratórios Ltda.

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.

Merck, Sharp & Dohme Ind. Quím. Farmacêutica Ltda.

**Efeito de antibióticos poliênicos
sobre *Saccharomyces cerevisiae* contendo
diferentes esteróis e
ácidos graxos insaturados incorporados
à membrana citoplasmática***

Maria Ligia Coutinho Carvalhal
Beatriz Ribas Castellani
& Flávio Alterthum

*Instituto de Química USP, Caixa Postal 20780,
01000 São Paulo SP, Brasil*

Resumo

Na membrana citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* foram incorporados diferentes esteróis e ácidos graxos insaturados. A seguir, foi testada a sensibilidade destas células frente à nistatina e anfotericina B. Através deste modelo biológico, foi constatado que células contendo ergosterol são mais sensíveis à ação dos polienos do que aquelas que contêm colesterol. Além disso, verificou-se que o número de insaturações da cadeia carbônica dos ácidos graxos tornam as células mais resistentes à ação letal da nistatina e da anfotericina B.

Summary

*The effect of polyene antibiotics was studied on cell suspensions of *Saccharomyces cerevisiae* containing different sterols and unsaturated fatty acids incorporated into the plasma membrane*

Cells containing ergosterol were more sensitive to nystatin and amphotericin B than those containing cholesterol. Moreover, resistance to polyene increased with the degree of unsaturation of the fatty acids.

Introdução

Saccharomyces cerevisiae, quando cultivado em condições de anaerobiose, torna-se auxotrófico para um esterol e um ácido graxo insaturado (2, 3). Nestas condições, se adicionarmos ao meio de cultura estes dois componentes, além de uma fonte de carbono, nitrogênio, sais minerais e algumas vitaminas, a levedura se desenvolve bem e incorpora tanto o esterol como o ácido graxo. Proudlock & col. (12) e posteriormente Hossack & Rose (9) incorporaram, na membrana de leveduras, ergosterol, β -sitosterol, stigmasterol e colesterol, ao passo que Alterthum & Rose (1) variaram os ácidos graxos, obtendo boa incorporação de ácidos oleico, linoleico e linolênico. Em ambos os casos, para esteróis e ácidos graxos insaturados,

as substituições são estequiométricas, não afetando a composição dos demais lípides.

A nistatina e a anfotericina B, como os demais polienos, alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática, liberando K^+ , Mg^{++} , NH_4^+ entre outros compostos. Isto se deve primariamente à formação de complexos polieno-esterol (8, 11).

Discute-se muito se a simples presença de esteróis, com determinados pré-requisitos, na molécula, seria o único fator responsável pela susceptibilidade de determinados microrganismos aos antibióticos poliênicos (4, 5, 13). Outros componentes, presentes na membrana, poderiam também estar relacionados à ação destas substâncias, como ácidos graxos e fosfolípideos. Assim sendo, procuramos neste trabalho variar, concomitantemente aos esteróis,

* Trabalho realizado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Processo 74/1102.

os ácidos graxos insaturados e testar a suscetibilidade de uma mesma amostra de *S. cerevisiae*, contendo variadas composições de membrana, frente à nistatina e à anfotericina B.

Material e Métodos

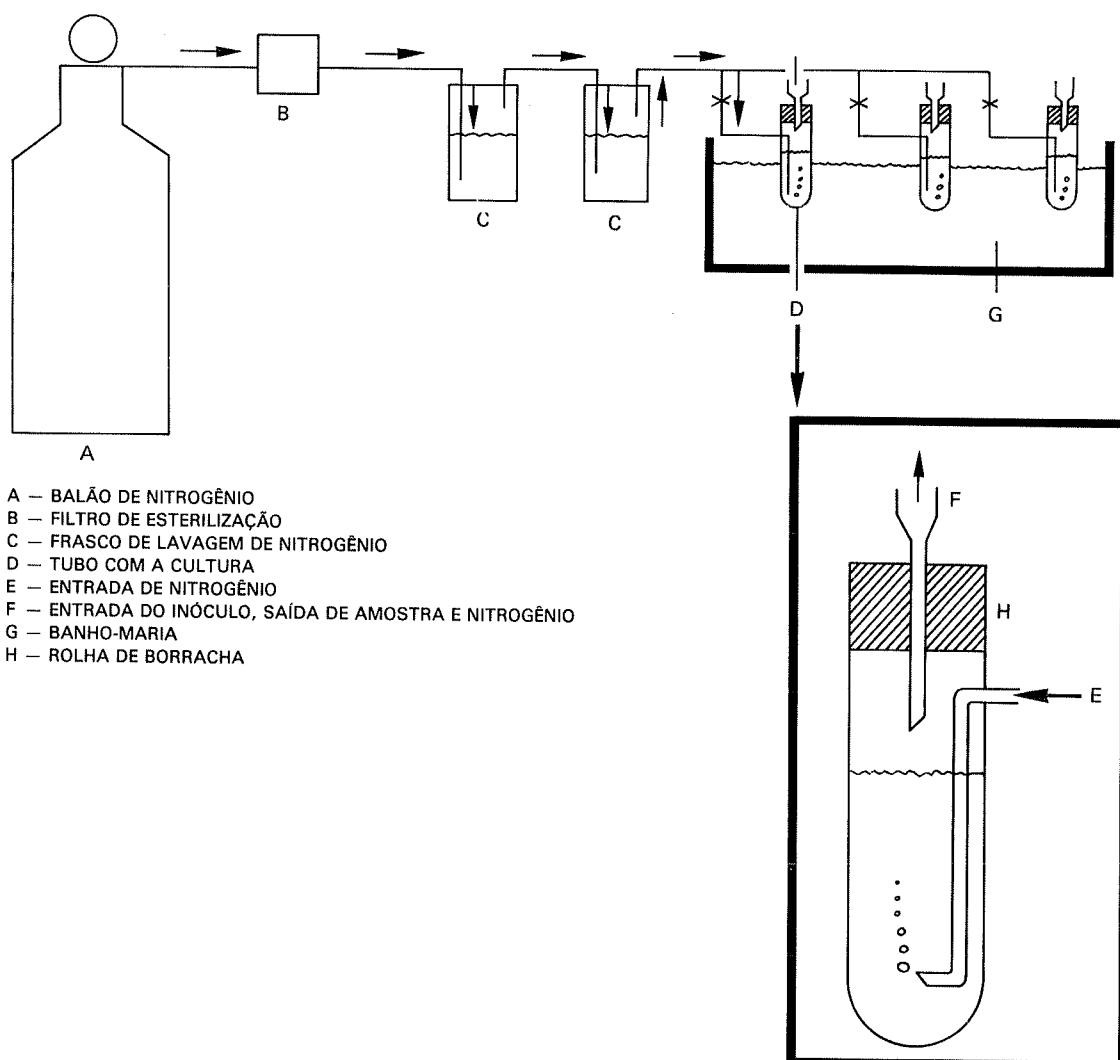
Microrganismos e meios de cultura — *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 366 foi mantido em meio de cultura (YPD), contendo glicose 2%, peptona 0,8%, extrato de levedura 0,6% e agar 1,5%, sendo repicado mensalmente. Para o crescimento em anaerobiose, o meio empregado foi o já descrito anteriormente (1). Para a contagem do número de unidades formadoras de colônias, utilizou-se o YPD.

Antibióticos — Anfotericina B e nistatina foram cedidas pela Squibb, Indústrias Químicas S.A.,

Brasil, conservadas na forma micropulverizada a 4°C. As soluções foram preparadas no dia de uso, dissolvendo-se 5mg em 1ml de dimetilsulfóxido e completando o volume para 10ml, com água destilada estéril.

Cultura em anaerobiose — Em tubos de 14,0 × 2,0cm, previamente lavados com clorofórmio-metanol (1:1 v/v) e contendo um dispositivo para borbulhar gás, colocou-se 10ml do meio de cultura líquido, acrescido do esterol e ácido graxo desejados. Após esterilização e antes de esfriar, os tubos foram retirados da autoclave e, através do meio de cultura, foi borbulhado nitrogênio U. A fim de eliminar traços de oxigênio, o gás foi borbulhado previamente em dois frascos lavadores, contendo a mistura de amálgama de zinco e cloreto de Cr⁺⁺⁺ (14). O sistema utilizado está esquematizado na Figura 1.

Figura 1 — Esquema do sistema para cultura em anaerobiose, do *Saccharomyces cerevisiae*



Os tubos foram inoculados com o correspondente a 0,002mg de peso seco de células/ml, obtidos de cultura estática, após 24 horas de crescimento. A seguir, os tubos foram incubados em banho-maria a 30°C. O crescimento foi acompanhado, fazendo-se leituras de absorbância em espectrofotômetro Coleman Jr. II (550nm). Da mesma maneira, inoculou-se um tubo controle em anaerobiose, onde o meio de cultura estava isento de esterol e ácido graxo insaturado.

Efeito dos polienos — Ao atingir o meio da fase logarítmica de crescimento, o conteúdo dos tubos foi centrifugado a 5000g, durante 2 minutos, a 4°C. A seguir, suspendeu-se o sedimento em 10ml de água destilada estéril e colocou-se novamente em tubos, borbulhando-se nitrogênio. Após 15 minutos em banho-maria a 30°C, adicionou-se o polieno na concentração desejada. Para contagem de viáveis, retiraram-se amostras através da rolha de borracha, com agulha de aço inoxidável. Após diluições convenientes, foram plaqueadas no meio já descrito e, depois de 48 horas, foram feitas as contagens das unidades formadoras de colônias.

Resultados e Discussão

Utilizando as mesmas condições de cultura, bem como a mesma levedura, Alterthum & Rose (1) e Hossack & Rose (9) analisaram os lípides de *S. cerevisiae* NCYC 366 e constataram a incorporação de 50 a 70% de ácidos graxos insaturados de 18 carbonos e cerca de 80% dos quatro esteróis que testamos.

Neste trabalho, constatamos que as células de *S. cerevisiae* que continham ergosterol, stigmasterol e β -sitosterol, mostraram-se mais sensíveis à anfotericina B do que as que possuíam colesterol (Tabela 1). Estes resultados mostram, num modelo biológico, a chave da aplicação dos antibióticos poliênicos ou seja, células fúngicas, que contêm ergosterol, são mais sensíveis do que células animais que contêm principalmente colesterol.

Uma das principais diferenças existentes, entre as moléculas dos esteróis, está na ramificação lateral, que se apresenta insaturada no ergosterol e stigmasterol e saturada no colesterol e β -sitosterol. É possível cogitar-se que a presença da dupla ligação, na cadeia lateral dos dois primeiros esteróis, facilitaria a interação hidrofóbica que se acredita existir entre o polieno e o esterol (11), causando maior desorganiza-

ção na membrana e justificando assim, as diferenças observadas.

Constatamos ainda que as células de levedura que contém ácidos graxos com maior número de insaturações, são mais resistentes à anfotericina B, em presença de qualquer um dos quatro esteróis utilizados. Estas diferenças se acentuam quanto maior for o tempo de contacto das células com o antibiótico. A presença de ácidos graxos com diferentes insaturações, poderia estar, por sua vez, afetando o estado de organização da membrana e a formação do complexo polieno-esterol. Hsu-Chen & Feingold (10) observaram que a incorporação de colesterol a lipossomos podia tanto aumentar como suprimir as alterações na permeabilidade causada por polienos, dependendo da estrutura dos ácidos graxos presentes nos fosfolípides dessas membranas. Os autores acreditam que a sensibilidade dos lipossomos aos antibióticos não estaria na dependência de um único componente, mas sim, do estado geral de organização de todos componentes.

O anel planar dos esteróis pode ajustar-se a região saturada dos fosfolípides, desde que haja, no mínimo, nove carbonos saturados perto do grupo carboxila em pelo menos um dos ácidos graxos (7), não importando se este esteja esterificado com o glicerol na posição I ou II. Lecitinas com cadeias de ácidos graxos 18:3, 18:3 e 18:2, 18:2 condensam menos em presença de colesterol (6). Se este fenômeno ocorrer em membranas naturais, parece válido discutir se a presença do ácido linolênico e linoleico, utilizados nas experiências e que foram incorporados pela levedura, não poderiam estar integrando menos com o esterol. O ácido linolênico tem 18 carbonos na cadeia e três insaturações, sendo a primeira delas entre os carbonos 6 e 7 e as demais entre os carbonos 9 e 10 e 12 e 13. O ácido graxo não teria, portanto, os nove primeiros carbonos saturados, que viriam a favorecer a interação com o esterol. Com isto, a molécula do esterol não estaria se colocando em posição favorável para permitir a interação com o polieno, fornecendo uma possível explicação para a maior resistência das células aos antibióticos (Tabelas 1 e 2).

Além desta explicação, poderíamos supor que o aumento na fluidez da membrana, pela presença de maior número de insaturações (6), faria com que o complexo polieno-esterol fosse menos estável e, consequentemente, as células sofreriam menor ação do agente testado.

Finalmente, não podemos afastar a idéia de uma parede modificada, uma vez que Alter-

thum & Rose (1) já observaram diferenças de sensibilidade à ação da glucanase, na obtenção de esferoplastos de células contendo diferentes ácidos graxos insaturados. Esta modificação

poderia depender da composição ou disposição dos componentes da parede celular, não permitindo o acesso do polieno a seu alvo preferencial, o esterol da membrana.

Tabela 1 — Ação da anfotericina B em suspensões não proliferantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Células contendo predominantemente	% de unidades formadoras de colônias após o contacto com a anfotericina B (2,5µg/ml)			
	30	60	90	120
Ergosterol + ác. oleico	17,2	6,1	4,3	1,9
Ergosterol + ác. linoleico	17,0	7,9	6,1	5,2
Ergosterol + ác. linolênico	46,2	34,3	29,1	28,5
Stigmasterol + ác. oleico	14,8	6,9	4,2	2,3
Stigmasterol + ác. linoleico	23,8	8,6	6,2	4,6
Stigmasterol + ác. linolênico	34,5	28,4	20,2	18,0
β -sitosterol + ác. oleico	20,0	8,9	4,5	3,7
β -sitosterol + ác. linoleico	23,8	13,9	11,8	10,6
β -sitosterol + ác. linolênico	48,1	43,9	37,6	31,5
Colesterol + ác. oleico	42,9	33,1	29,0	24,1
Colesterol + ác. linoleico	60,8	45,0	36,6	33,3
Colesterol + ác. linolênico	66,6	52,0	46,1	40,0

Tabela 2 — Ação da nistatina em suspensões não proliferantes de *Saccharomyces cerevisiae*

Células contendo predominantemente	% de unidades formadoras de colônias após o contacto com a nistatina (2,5µg/ml)			
	30	60	90	120
Ergosterol + ác. oleico	10,0	4,1	1,8	0,7
Ergosterol + ác. linoleico	9,2	5,2	2,9	2,0
Ergosterol + ác. linolênico	10,0	6,2	6,2	5,1
Colesterol + ác. oleico	45,0	33,3	27,5	24,1
Colesterol + ác. linoleico	43,8	34,6	33,0	29,2
Colesterol + ác. linolênico	55,4	54,5	56,3	55,4

Referências Bibliográficas

1. Alterthum, F. & Rose, A.H. — Osmotic lysis of spheroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different unsaturated fatty acids. *J.Gen.Microbiol.*, 77:371-382, 1973.
2. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I — Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J.Cell Comp. Physiol.*, 41:23-36, 1953.
3. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II — Unsaturated fatty acids requirement for growth in a defined medium. *J. Cell Comp. Physiol.*, 43:271-281, 1954.
4. De Kruyff, B.; Gerritsen, W.J.; Oerlemans, A.; Demel, R.A. & Van Deenen, L.L.M. — Polyene antibiotic sterol interactions in membranes of *Acholeplasma laidlawii* cells and lecithin liposomes. I — Specificity of the membrane permeability changes induced by the polyene antibiotics. *Biochim. Biophys. Acta*, 339:30-43, 1974.
5. Demel, R.A. & De Kruyff, B. — The function of sterols in membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 457:109-132, 1976.
6. Demel, R.A.; Vankessel, W.S.M.G. & Van Deenen, L.L.M. — The properties of polyunsaturated lecithins in monolayers and liposomes and the interactions of these lecithins with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, 266:26-40, 1972.

7. Gosh, D.; Williams, M. & Tinoco, J. — The influence of lecithin structure on their monolayer behavior and interactions with cholesterol. *Biochim. Biophys. Acta*, 291:351-362, 1973.
8. Hammond, S.M. — Biological activity of polyene antibiotics. *Prog. Med. Chem.*, 14:106-179, 1977.
9. Hossack, J.A. & Rose, A.H. — Composition of lipids and fragility of plasma membranes in *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in presence of different sterols. *J. Bact.*, 127:67-75, 1976.
10. Hsu-Chen, C. & Feingold, D.D.S. — Polyene antibiotic action on lecithin liposomes: effect of cholesterol and fatty acyl chains. *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 51:972-978, 1973.
11. Norman, A.W.; Spielvogel, A.M. & Wong, R.G. — Polyyne antibiotic-sterol interaction. *Adv. Lipid Res.*, 14:127-170, 1976.
12. Proudlock, J.W.; Wheeldon, L.W.; Jollow, D.J. & Lin-nane, A.W. — Role of sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 152:434-437, 1968.
13. Shimizu, M.T. & Alterthum, F. — Estudo comparativo entre o conteúdo de esteróis e resistência a polienos em diferentes espécies de leveduras. *Rev. Microbiol.*, 10:14-18, 1979.
14. Vogel, A.I. — A text-book of practical organic chemistry. 3.ed. London, Longmans, 1957.

Diagnóstico de infecções por rotavírus através da reação de imunofluorescência indireta*

José Alberto Neves Candeias

Deptº de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas USP, Setor Saúde Pública, Caixa Postal 4365, 01000 São Paulo SP, Brasil

Evandro Roberto Baldacci

Deptº de Pediatria Clínica do Instituto da Criança, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina USP, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, s/nº, 01000 São Paulo SP, Brasil

José Carlos Breviglieri

Deptº de Pediatria Clínica do Instituto da Criança Sandra Josefina Elero Grisi

Deptº de Pediatria Clínica do Instituto da Criança Maria Lúcia Rácz

Deptº de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas & Charlotte Harsi

Deptº de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas

Resumo

Utilizando a técnica de imunofluorescência indireta, foram estudados 74 casos de gastroenterite infantil para a identificação de rotavírus nas fezes. Deste total, 25 casos foram testados em microplacas com culturas de LLCMK₂, tendo-se obtido uma porcentagem de positividade de 28,0%; os 49 casos restantes foram testados em cultura de LLCMK₂, preparadas em tubos de fundo chato, com positividade de 32,6%.

Summary

The indirect immunofluorescent test in diagnostic of rotavirus infections

Seventy four cases of infantile gastroenteritis were examined for rotavirus identification, in the feces, using indirect immunofluorescence test. Twenty five of these were tested in LLCMK₂ cultures prepared in microtiter plates and 49 in flat bottom tissue culture tubes with confluent coverslip cultures of LLCMK₂. The percentage of positive results were, respectively, 28,0% and 32,6%.

Introdução

De um modo geral, os rotavírus de diversas espécies animais não podem ser isolados, facilmente, em culturas celulares, muito embora possam ocasionar infecção celular, com síntese de algumas proteínas virais, sem que, no entanto ocorra a formação de partículas virais infeciosas. Independentemente da linhagem celular utilizada, a eficiência do inóculo pode ser melhorada, acentuadamente, mediante a simples centrifugação daquele a 2.000rpm durante 60 minutos, sobre a cultura celular confluente. Este sistema, com 18 a 24 horas de incubação a 37°C, permite a visualização, por imunofluores-

cência, das proteínas virais sintetizadas (2). Woode & col. (7) descrevem a utilização da técnica de imunofluorescência, sem centrifugação prévia, no diagnóstico da diarréia de vitelos. Banatvala & col. (1) foram os idealizadores da técnica de centrifugação dos extratos fecais sobre a cultura celular, tendo-a utilizado, com resultados reproduutíveis, no diagnóstico de infecções humanas. O uso da técnica de imunofluorescência em microplacas semeadas com a linhagem celular LLCMK₂ permite o diagnóstico rápido de infecções por rotavírus, em número substancial de amostras, obtendo-se resultados

* Trabalho realizado com recursos do CNPq (Processo 40.2411/79).

que podem ser comparados, favoravelmente, com os conseguidos na microscopia eletrônica (2, 6).

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de aplicar a técnica da imunofluorescência na identificação de rotavírus em quadros de gastroenterites infantil.

Material e Métodos

Amostras — Foram estudadas 74 amostras de fezes, provenientes de quadros de gastroenterite de crianças admitidas no Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, da Universidade de São Paulo, de fevereiro de 1978 a abril de 1979. As amostras foram suspensas em solução salina fosfatada 0,01M, pH 7,2, de modo a se obter uma suspensão à 20%, aproximadamente; esta suspensão, após homogeneização, foi centrifugada a 3.000rpm, durante 15 minutos, sendo o sobrenadante utilizado imediatamente, ou após estocagem a -20°C. Do total de amostras referido, 25 foram testadas em culturas de LLCMK₂, preparadas em microplaca com cavidades de fundo chato de 6,5mm de diâmetro (Flow Laboratories) e as 49 restantes em culturas da mesma linhagem celular, preparada em tubos de 85 × 20mm, com fundo chato, contendo lamínulas de 17mm de diâmetro, sobre as quais se desenvolvia a camada celular confluente.

Técnica de imunofluorescência — As culturas de LLCMK₂ foram preparadas em meio de Eagle, em solução de Earle, suplementado com 10% de soro fetal bovino, durante o período de multiplicação celular, 2% de soro fetal bovino no período de manutenção e contendo 100U de penicilina/ml, 100µg de estreptomicina/ml e 5µg/ml de fungizona.

O exame em microplaca foi feito segundo a técnica original de Bryden & col. (2). No exame em tubos, um inóculo de 0,2ml de suspensão fecal era misturado com 1,8ml de meio de Eagle com 2% de soro fetal bovino e antibióticos, depois do que se procedia a centrifugação em centrífuga não refrigerada, Modelo V, "International", rotor 250, a 2.000rpm durante 60 minutos, seguida de incubação por 18 a 24h a 37°C. Para realização da reação de imunofluorescência indireta, as lamínulas, com culturas confluentes de LLCMK₂, eram cuidadosamente lavadas em solução salina fosfatada 0,01M, 7,2, fixadas em metanol, submetendo-se, em segui-

da à coloração para imunofluorescência, segundo a técnica de Bryden & col. (2).

O exame das microplacas foi feito em microscópio de epi-iluminação, através do fundo das placas; para o exame das lamínulas, após a coloração de imunofluorescência, estas foram montadas sobre lâmina, em glicerol tamponado pH 8,4 e examinadas em microscópio de fluorescência de transiluminação.

Resultados e Discussão

Do total de 74 amostras de fezes examinadas, 23 (31,1%) foram positivas. Das 25 amostras testadas em microplaca, sete foram consideradas positivas (28,0%); das 49 amostras testadas em tubo, dezesseis foram positivas (32,6%). A fluorescência observada era sempre de localização citoplasmática, umas vezes difusa, outras granular, sem extensão nuclear. Em algumas amostras, observavam-se células multinucleadas, ocorrência que não parece poder relacionar-se com um eventual tipo de efeito citopático, uma vez que nos controles não inoculados das culturas de LLCMK₂ também surgiam estas alterações.

Os resultados do presente trabalho confirmam os obtidos por outros autores, em termos da utilidade da técnica de imunofluorescência indireta, após centrifugação dos extratos fecais sobre culturas celulares (1, 2, 4, 5). Quanto à utilização de culturas celulares, em microplacas ou em tubos com lamínula, por certo, a primeira oferece maiores vantagens, particularmente, quando há necessidade de se proceder ao exame de grande número de amostras. No entanto, a centrifugação das microplacas, após inoculação dos extratos fecais, obriga à utilização de suportes especiais, o que não sucede quando se usam os tubos de fundo chato com lamínula. Uma outra vantagem do emprego dos tubos reside no fato de ser dispensável a microscopia de epi-iluminação; a espessura das microplacas não permite o exame nos microscópios de uso corrente em que a radiação excitante é dirigida, por reflexão, ao condensador e deste ao preparado, que deve obviamente, ser suficientemente delgado para permitir a passagem da radiação, o que ocorre quando se usam lamínulas montadas em lâmina.

As diferentes porcentagens de positividade obtidas, 28,0% nos exames feitos em microplaca e 32,6% nos exames feitos em lamínula, situam-se dentro de limites aceitáveis de erro experimental. Em ambas as modalidades da técni-

ca, tanto a proporção de células fluorescentes, quanto a qualidade de fluorescência eram semelhantes.

Tanto na micro como na macrotécnica podem ocorrer casos de toxidez das amostras fe-

cais, situação que, por vezes, leva à total destruição celular; nos casos de destruição parcial, muito embora seja possível, em alguns casos, fazer a leitura, os resultados devem ser considerados com reserva.

Referências Bibliográficas

1. Banatvala, J.E.; Totterdell, B.; Chrystie, I.L. & Woode, G.N. — In vitro detection of human rotavirus. *Lancet*, 2:821, 1975.
2. Bryden, A.S.; Davies, H.A.; Thouless, M.E. & Flewett, T.H. — Diagnosis of rotavirus infection by cell culture. *J.Med. Microbiol.*, 10:121-125, 1977.
3. Camargo, M.E. — Introdução às técnicas de imuno-fluorescência. *Rev.bras.Pat.Clin.*, 10:57-171, 1974.
4. Elias, M.M. — Distribution and titres of rotavirus antibodies in different age groups. *J.Hyg.(Camb.)*, 79:365-372, 1977.
5. Ellens, D.J.; Leeuw, P.W.; Straver, P.J. & van Balken, J.A.M. — Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigens in calf faeces. *Med.Microbiol.Immunol.*, 166:157-163, 1978.
6. Flewett, T.H. & Woode, S.N. — The Rotaviruses: brief review. *Arch.Virology*, 57:1-23, 1978.
7. Woode, S.N.; Bridger, J.C.; Hall, G. & Dennis, M.J. — The isolation of reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum — deprived calves in Great Britain. *Res.vet.Sci.*, 16:102-105, 1974.

The structure of Omega virus: a temperate phage of *Staphylococcus epidermidis**

Fernando Portela Câmara

Instituto de Biofísica da UFRJ,
Centro de Ciências da Saúde, Bloco G
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

The ω phage is a typical DNA phage, i.e., it is structurally composed by an icosahedral head and a flexible non contractil tail for adsorption and DNA injection. Its genome is a double stranded DNA and experiments of elimination with acridine orange suggests that the phage genome is integrated in the bacterial chromosome.

Resumo

A estrutura do vírus Ômega: um fago temperado do Staphylococcus epidermidis

O bacteriófago ω é um fago a DNA típico, i.e., estruturado por uma cabeça poliédrica de simetria icosaédrica e uma cauda flexível, não contrátil, para sua adsorção e injeção do seu DNA na bactéria hospedeira. Seu genoma é um DNA duplamente filamentado, que parece estar ligado covalentemente ao cromossoma bacteriano durante a fase lisogênica.

Introduction

Virus ω , a temperate phage found in the P strain of *Staphylococcus epidermidis* was discovered in the late fifties by Marcovich (Caldas, personal communication) and named " ω " by Caldas (personal communication and reference 5), before this designation had been used for classification of certain pneumococcal phages (11) and *Agrobacterium tumefaciens* phages (8).

The P strain of *S. epidermidis* (ω) has a spontaneous induction of 10% and a burst-size of 40-80 virus/bacterium with a latent period of 45 minutes (5).

In this paper I studied the structure of virions ω and the nature of its genome.

Material and Methods

Strains — The lysogenic and indicator strains of P *S. epidermidis* was originally obtained

from miss Crelir Monteiro de Souza (Instituto de Biofísica, UFRJ).

Media — YET medium (in g/liter of deionized water): Yeast Extract (Difco), 5; Tryptone (Difco), 8; Sodium Chloride (Carlo Erba), 5; pH 7.2 (9). Agar (Difco) was added to final concentration of 1.5% (for plates) or 0.7% (for soft agar tubes) when this was necessary. Magnesium ions were added to a final concentration of 10^{-3} M in all media.

Phage assay — A log culture (10^8 cells/ml, approximately) in YET medium was induced with 600ergs/mm² (total dose) with U.V. lamp (GE germicide). When necessary, the post-induced cultures were treated with Actinomycin-D (5g/ml, Sigma). The phage plaque assay was conducted according Eisenstark (7) and Ribonuclease A (100g/ml, Sigma) was added to soft agar (1) when this was necessary.

* Supported by Grant 2222.1418/77 of CNPq (P.I.G.-II), CEPG/UFRJ and FINEP (375/CT and B-76-79-074).

Acridine orange treatment — Lisogenic cultures were grown overnight in a solution of acridine orange (50 μ g/ml) in YET broth in the dark (6) and 500 colonies were tested for lysis after U.V. induction.

Concentration and purification of phages — These were conducted according to Yamamoto & col. (13). The polyethylene glycol 6000 (Sigma) was used in a concentration of 9% plus 0.5M of sodium chloride and the overnight precipitate (at 4°C) was collected and layered on the top of a cesium chloride (Sigma) gradient (density range of 1.3 to 1.6) and centrifuged in a rotor 50.1 (Beckmann ultracentrifuge L-50) for 2.5 hours at 4°C at 30.000 rpm. The phage band was collected and dialysed overnight in 10 $^{-3}$ M of Mg⁺⁺ ions in deionized water.

Nucleic acid determination — Purified phages were used for nucleic acid determination through colorimetric method of orcinol/diphenilamine (10) and by the fluorescence method of acridine (3).

Electron microscopy — Purified preparations of phage were examined in the electron microscope after being negatively stained with sodium silicotungstate (12).

Results and Discussion

Induction of ω phage — A titer of 3.10¹⁰pfu/ml of phage were released in a U.V. induced cultures in log phase, when Mg⁺⁺ ions concentration was 10 $^{-3}$ M. In the absence of this ions the titer changes to 10⁷pfu/ml. Thus, the Mg⁺⁺ ions are essential for maturation of phage particles in its replicative cycle.

Nucleic acid determination — Induced culture treated with Actinomycin D show significant reduction of phage titers (Table 1). The control of this experiments was induced cultures of *Escherichia coli* (λ) (phage inhibited by Actinomycin D in several logarithmic unit) and the growing of R17 phage (a RNA virus insensible to Actinomycin D) in *E. coli* HfrH. The ω phage was not inhibited by RNase treatment (Table 1) and the controls of this experiment was conducted with T4 (a DNA phage) and R17 (that is inhibited by RNase in several logarithmic unities).

The treatment of lysogenic cultures for ω with acridine orange don't eliminate this character. This fact suggests that genome could be integrated in the bacterial chromosome.

The fluorescence test with acridine orange stresses the double stranded DNA nature of ω phage genome and the orcinol-diphenilamine index is also positive for DNA (Table 2).

Table 1 — Effect of RNase and actinomycin D on ω phages

(A) RNase (100 μ g/ml)		with RNase (pfu/ml)
control (pfu/ml)		
6.4 \times 10 ⁹		4.4 \times 10 ⁸
<hr/>		
(B) Actinomycin D (5 μ g/ml)		
control without U.V. induction (pfu/ml)	control with U.V. induction (pfu/ml)	U.V. induction with Actinomycin D (pfu/ml)
1.7 \times 10 ⁷	3.2 \times 10 ⁶	2.0 \times 10 ⁶

Table 2 — Colorimetric determination of ω phage nucleic acid using orcinol and diphenilamine reactions*

Nucleic acid	Diphenilamine index (OD ₆₀₀ /OD ₂₆₀)	Orcinol index (OD ₆₇₀ /OD ₂₆₀)
DNA (Calbiochem)	0.325	0.180
RNA (Sigma)	0.003	0.185
Phage	0.285	0.090

*OD — optical density

Electron microscopy — The ω phage is made up a polyhedral head with icosahedral symmetry (Figure 1) with apparent diameter of $550 \pm 50\text{\AA}$, and a long flexible tail of $1400 \pm 100 \times 80 \pm 10\text{\AA}$. Structural components of the tail are found in a linear periodical disposition (axial repetition of 35\AA) ending up in a starshaped baseplate of sixfold simmetry to which six small fibers ($200 \pm 20\text{\AA}$) ending in a small knob are fixed (Figure 1).

The structural components of the tail seems to be in "stacked discs" rather than a helical type of arrangement (Figure 2). The tail of pha-

ge is fitted into the hole in the capsid with a knob inside (Figure 2).

Thus, this phage is a tipical DNA bacterial virus similar to the phages os *Staphylococcus aureus* (4) and *Streptococcus pneumoniae* (11, 21) in its physical aspects.

Acknowledgements

I am very gratefull to Dr. Maria Luisa Lopez of the Department of Virology of the Instituto de Microbiologia (UFRJ) for the electron micrographs used in this paper.

References

1. Ackermann, H.W.; Audunier, A.; Berthiaume, L.; Jones, L.A.; Mayo, J.A. & Vidaver, A.K. — Guidelines for bacteriophage characterization. In: — Lauffer, M.A.; Bang, F.B.; Maramorosch, K. & Smith, K.M., eds. — Advances in virus research. New York, Academic Press, 1978. p.1-24.
2. Bernheimer, H.P. — Lysogenic in pneumococci freshly isolated from man. *Science*, 195:66-68, 1977.
3. Bradley, D.E. — Staining of bacteriophage nucleic acids with acridine orange. *Nature*, 205:1187-1190, 1965.
4. Brown, D.T.; Brown, N.C. & Burlingham, B.T. — Morphology and physical properties of *Staphylococcus* bacteriophage P11-M15. *J. Virol.*, 9:664-671, 1972.
5. Caldas, L.R. — Estudo radiobiológico do sistema lisogênico do *Staphylococcus albus*. Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica UFRJ, 1963. (PhD Thesis).
6. Clowes, R.C. & Hayes, W. — Experiments in microbial genetics. Oxford, Blackell Sci. Publ., 1968.
7. Eisenstark, A. — Bacteriophage techniques. In: — Maramorosch, K. & Koprowski, H., eds. — Methods in virology. New York, Academic Press, 1967. p.449-524.
8. Ley, A.N.; Warner, H.R. & Kahn, P.L. — Virulent bacteriophage infection of *Rhizobium leguminosarum*. *Canad. J. Microbiol.*, 18:375-380, 1972.
9. Miller, J.H. — Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbor Lab., 1972.
10. Shatkin, A. J. — Colorimetic reactions for DNA, RNA, and protein determination. In: — Habel, K. & Salzman, N.P., eds. — Fundamental techniques in virology. New York, Academic Press, 1969. p.231-237.
11. Tiraby, J.G.; Tiraby, E. & Fox, M.S. — Pneumococcal bacteriophage. *Virology*, 68:566-569, 1975.
12. Wrigley, N.G. — An electron microscope study of the structure of sehestis iridescent virus. *J. Gen. Virol.*, 5:123-132, 1969.
13. Yamamoto, K.R.; Alberts, B.M.; Benzinger, R.; Lawhorne, L. & Treiber, G. — Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. *Virology*, 40:734-744, 1970.

Figure 1 — General appearance of ω phages in a magnification of 227,500X (a and b). The arrow in b show a typical base plate of this phage. Note its tail in a stacked disc arrangement

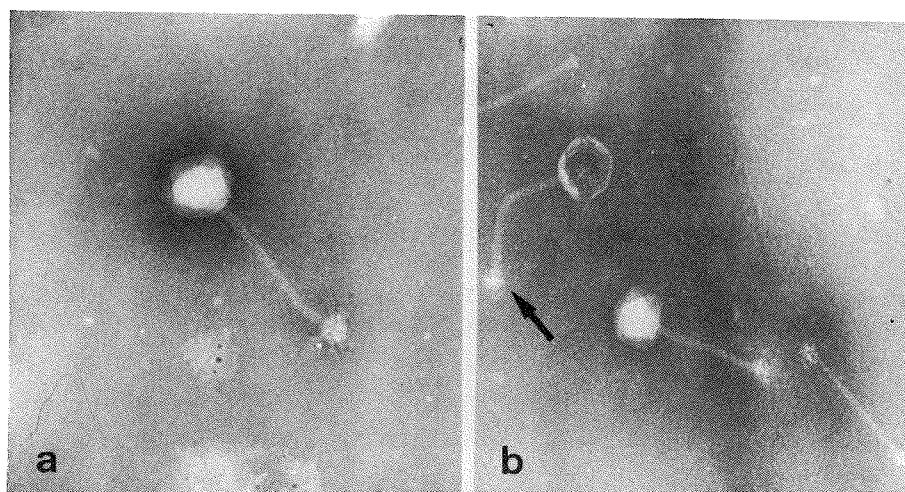
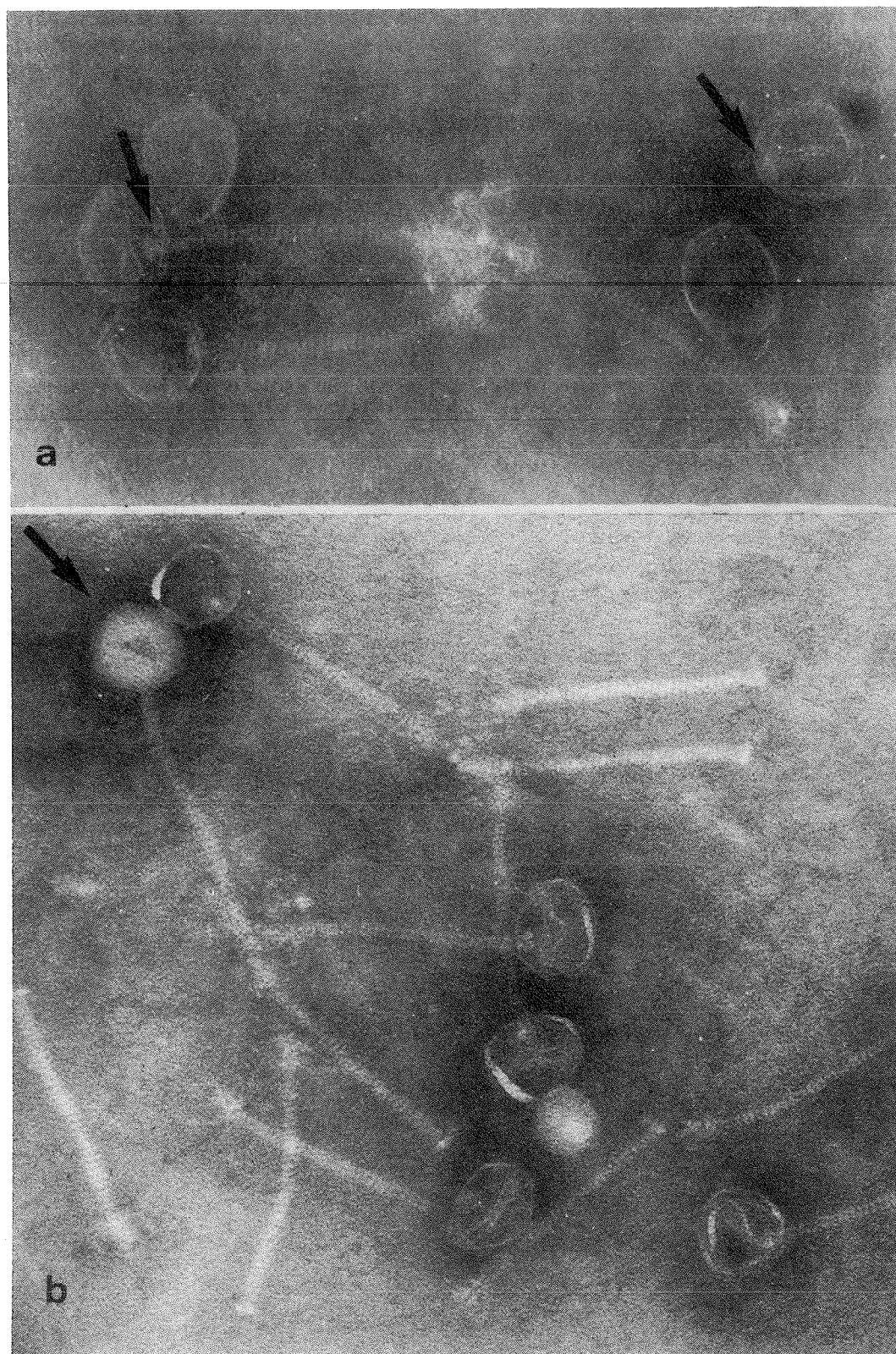


Figure 2 — Polyhedral heads of ω phages with edges pattern of a icosaedral solid. The arrows in a, shows a knob of insertion tail-head. The arrow in b show a typical hexagonal profile of phage head. Note the stacked-discs arrangement of tails. a: 171,000X; b: 135,000X



Identificação sorológica e sensibilidade a drogas de amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em São Paulo*

Angela C. Rodrigues
 Antonio Fernando Pestana de Castro
 Marlene Braide Serafim
*Dept.^o de Microbiologia e Imunologia UNICAMP
 13100 Campinas SP, Brasil*
 & Waldir Giorgi
*Instituto Biológico, Caixa Postal 7119
 01000 São Paulo SP, Brasil*

Resumo

Trinta e quatro amostras de *P. multocida* isoladas de coelhos e aves doentes foram examinadas quanto à sua constituição antigênica. Utilizando o teste de hemaglutinação passiva, com hemácias sensibilizadas por extratos bacterianos tratados pela hialuronidase, todas as amostras foram classificadas como pertencentes ao tipo sorológico A de Carter. A determinação do antígeno somático revelou que das 27 amostras isoladas de coelho, 25 pertenciam ao sorogrupo 9. Entre as amostras isoladas de aves a diversidade de sorogrupos foi maior, mas houve predominância também do sorogrupo 3, presente em 4 das 7 amostras. Outros sorogrupos encontrados foram 5, 7 e 8. Paralelamente é descrito um teste presuntivo para a identificação do tipo sorológico A, utilizando a inibição de crescimento mucóide pela hialuronidase. Em relação aos testes de sensibilidade a drogas, as amostras de *P. multocida* estudadas se mostraram altamente sensíveis a quase totalidade das drogas, exceção feita às sulfonamidas, para as quais foram encontrados níveis de concentração inibitória mínima mais elevados, porém, não superiores a 100 μ g/ml.

Summary

Serological identification and drug sensitivity of Pasteurella multocida strains isolated in São Paulo, Brazil

Thirty-four strains of *P. multocida* isolated from sick rabbits and poultry were examined serologically. Using the passive hemagglutination test, sheep red blood cells sensitized with bacterial extracts treated by hyaluronidase indicated that these strains belonged to Carter's type A. As far as somatic antigen is concerned, 25 out of 27 strains isolated from rabbits belonged to serogroup 3, being the other two classified as serogroup 9. Among the strains isolated from poultry serogroup 3 was found in 4 out of 7 strains. Other serogroups found were 5, 7 and 8. A presumptive test for the identification of type A, based on the inhibition of mucoid growth by hyaluronidase treatment, is described. Regarding the sensitivity tests, the strains of *P. multocida* were highly sensitive to most drugs used, with the exception to sulphonamides, whose minimal inhibitory concentrations were higher than those found for other drugs, though not superior to 100 μ g/ml.

Introdução

P. multocida é um exemplo clássico de bactéria oportunista envolvida em diversas infecções que acometem espécies de animais domésticos de interesse econômico.

Em outros países, têm se dado grande importância a pesquisas sobre a freqüência dos soro-

tipos isolados dessas infecções. Neste particular, os estudos iniciais foram realizados por Roberts (17) que, utilizando o teste de imunoproteção cruzada, em camundongos, estudou 37 amostras de *P. multocida*, distribuindo-as em 4 tipos, denominados, a saber: I, II, III, IV. Posteriormente, Carter (2), através do teste de precipitação, demonstrou que os抗ígenos capsu-

* Trabalho realizado com auxílio do CNPq.

lados de *P. multocida* podiam ser subdivididos em 4 tipos sorológicos, por ele denominados A, B, C e D. Este mesmo autor (3), descreveu um teste de hemaglutinação passiva mais sensível, no qual a substância capsular, uma vez extraída, era adsorvida em hemácias. Outro tipo adicional E foi descrito mais tarde (4) e o tipo C eliminado, em virtude das dificuldades em aceitá-lo como um tipo sorológico distinto (5). Com algumas amostras capsuladas, bem mucoides, consideradas como não tipáveis, observou-se que o tratamento pela hialuronidase hidrolisava o ácido hialurônico presente, que impedia a extração do antígeno tipo específico (6, 16). A determinação do antígeno somático, segundo observações mais recentes, é também indispensável, uma vez que existem indicações de que ele seria igualmente importante na imunoproteção observada em animais vacinados (15).

Apesar das provas de hemaglutinação passiva, para determinação do tipo sorológico de *P. multocida*, já terem sido descritas há cerca de 26 anos, não encontramos, na literatura nacional, nenhum relato sobre estudos desta natureza em nosso meio. Deste modo, um dos objetivos de nossa pesquisa foi determinar as características sorológicas quanto a antígenos capsulares (tipo-específicos) e somáticos (grupo-específicos) de amostras de *P. multocida* isoladas entre nós. Paralelamente, é descrito um teste presuntivo para identificação do tipo sorológico A, a fim de se evitar uma metodologia sorológica mais elaborada e nem sempre ao alcance de laboratórios mais modestos.

Com relação a sensibilidade a drogas, os comentários poderiam ser semelhantes, isto é, o assunto já foi exaustivamente estudado entre nós, para outros gram-negativos (18) mas não encontramos, entre as pesquisas nacionais, trabalhos que tenham se preocupado em averiguar os níveis de resistência a drogas em amostras de *P. multocida*.

Material e Métodos

Amostras — As amostras padrão A14 (origem caprina), B3 (origem bovina), D4 (origem porcina) e E12 (origem bovina) pertencentes respectivamente aos tipos sorológicos A, B, D e E, usadas para o preparo de antígenos e antisoros, nos foram gentilmente cedidas pelo Dr. P. Perreau do "Institut d' Elevage et Medecine Vétérinaire de Tropicaux, Maison, Alfort, France."

Foram estudadas 34 amostras de *P. multocida* isoladas de coelhos e aves. Vinte e sete amostras de coelhos, identificadas pelos números 8, 16, 20, 27, 28, 29, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 44, 45, 48, 49, 50, 51, 54, 57, 58, 59 e 60, foram obtidas a partir de 60 animais abatidos em matadouro da região de Campinas: Foram selecionados animais que apresentassem lesões pulmonares sob a forma de abscessos ou processos pneumônicos, a partir dos quais procedeu-se o exame bacteriológico e identificação bioquímica dos microrganismos isolados conforme preconizado por Giorgi & col. (11). As amostras isoladas de aves (patos e galinhas) nos foram remetidas pelo Sr. Victório Chiarelli, da Secção de Doenças das Aves do Instituto Biológico de São Paulo. Estas foram identificadas por números fornecidos pela Instituição de origem, a saber: 68605, 68619, 68624, 68656 e 68685.

A manutenção dos microrganismos foi feita em ágar-sangue de carneiro e em sangue desfibrinado de coelho. Neste caso, os animais eram sangrados em condições assépticas e o sangue desfibrinado era distribuído em tubos estéreis 13 × 130mm em volume de 2ml por tubo. Estes eram semeados com as amostras de *P. multocida*, incubados a 37°C por 24 horas, sendo posteriormente colocados em congelador a -30°C.

Características sorológicas — Preparo de antisoros — Foram utilizados dois coelhos para cada amostra padrão. Para o preparo do inóculo, crescimento confluinte de garrafas de Roux, com meio de ágar triptose, incubadas a 37°C por 24h, foi suspenso em solução fisiológica tamponada 0.05M, pH 7.2 (PBS) e padronizado ao tubo 3 da escala de MacFarland, adicionando-se formol, na concentração de 0.3%. Os animais foram inoculados via intravenosa, com as doses crescentes de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0ml dessa suspensão, com intervalos de 3 dias, fazendo-se sangria de prova, 6 dias após a última inoculação. Os coelhos que apresentassem títulos iguais ou superiores a 1:512 foram sangrados. Os antisoros obtidos, adicionados de mertiolato 1:10.000 foram distribuídos em pequenos volumes (2ml) e mantidos a -30°C. A fim de se averiguar a especificidade dos mesmos, cada antisoro foi submetido a reação de hemaglutinação passiva com hemácias sensibilizadas com antígenos padrão heterólogos.

Preparo de extratos bacterianos — Procedeu-se conforme recomendado por Carter (6), com

algumas modificações. As bactérias a serem tipificadas foram cultivadas em placas de Petri, contendo agar triptose. Após incubação a 37°C por 48h, o crescimento de cada placa foi ressuspenso em 3ml de PBS, contendo cerca de 600 URT — (unidades redutoras de turvação) de hialuronidase Ritcher (Laboratório Lepetit). As suspensões assim tratadas foram colocadas em banho-maria a 56°C sob agitação (100rpm) por 4 horas. Após centrifugação a 3000rpm por 40min, os sobrenadantes foram separados e a quantidade de polissacarídeos determinada pelo método de Dubois (9).

Técnica de reação de hemaglutinação passiva — Foram utilizadas hemácias de carneiro coletadas em solução de Alsever (1). Os antisoros foram absorvidos com hemácias de carneiro, na proporção de 2ml de soro para 0.3ml de papa de hemácias. Após incubação a 37°C por 2h, os antisoros foram centrifugados, para separação das hemácias, sendo em seguida inativados a 56°C por 30min. Nos dias de teste as hemácias foram centrifugadas e ressuspensas em PBS na concentração final de 10%. A sensibilização foi feita a 37°C por 2 horas, utilizando-se, para cada 1ml de hemácias a 10%, extratos convenientemente diluídos de modo a conter 100 μ g/ml de polissacarídeo. Após a sensibilização, as hemácias foram lavadas 2 vezes em PBS e ressuspensas no mesmo tampão na concentração final de 1%.

As reações de hemaglutinação foram realizadas em placas de acrílico com batoques removíveis. A cada 0.5ml de diluição seriada do antíssoro razão de 2, de 1:10 a 1:2560, foram adicionados volumes idênticos de hemácias sensibilizadas por extratos das amostras de *P. multocida* em estudo. Em todos os testes, incluiu-se, como controle, tubos com hemácias sensibilizadas e PBS, bem como reações homólogas e heterólogas de hemácias sensibilizadas com os extratos de amostras padrão e os respectivos antíssoros. As reações foram lidas após 2 horas a temperatura ambiente, considerando-se como título final a maior diluição de antíssoro que ocasionava 50% de hemaglutinação. Uma determinada amostra de *P. multocida* foi considerada como pertencente a um dos tipos sorológicos quando hemácias sensibilizadas como seu extrato, reagiram com um dos antíssoros padrão em títulos iguais ou equivalentes aos obtidos na reação homóloga, permitindo-se variações de uma diluição abaixo ou acima do título observado.

As características sorológicas quanto ao antígeno somático foram gentilmente estudadas pelo Dr. Perreau (Institut D'Elevage de Médécine Vétérinaire de Pays Tropicaux, Alfort, França) de acordo com a técnica preconizada por Namioka & Murata (15).

Identificação do tipo sorológico A pela hialuronidase — Amostras de *P. multocida* recém-isoladas, em virtude da presença de ácido hialurônico na cápsula destas bactérias geralmente apresentam colônias maiores e de aspecto mucóide.

O efeito da hialuronidase na diminuição das dimensões da colônia e no desaparecimento do aspecto mucóide já haviam sido estudados por Carter & Rundell (8). Estes autores, para conseguirem este efeito, utilizaram, uma cultura de *Staphylococcus aureus*, produtora de hialuronidase, que era semeada em meio sólido perpendicularmente às amostras de *P. multocida*. Nessa investigação usou-se 0.1ml de uma solução de hialuronidase (Laboratório Lepetit) contendo 500 UTR espalhado cuidadosamente na metade da superfície de uma placa de agar-sangue. A placa era incubada a 37°C por 1h, para evaporação da parte líquida, fazendo-se em seguida a semeadura das bactérias em estudo, a partir do crescimento em BHI, diluído 1:1000, nas zonas da placa contendo ou não hialuronidase. Procedeu-se desta maneira com várias amostras 34, 37, 38, 41, 44, 48, 51, 54, 57 e 58, que apresentavam aspecto mucóide, incubando-se em seguida as placas a 37°C por 24h. Após a incubação, o crescimento em ambas as áreas das placas foi examinado comparativamente para cada amostra estudada. O desaparecimento do aspecto mucóide do crescimento bacteriano na área do meio de cultura contendo hialuronidase identificou presuntivamente o tipo A.

Sensibilidade a drogas — Para avaliar a sensibilidade a drogas, utilizamos o método de diluição em placa, conforme preconizado por Fernandes (10), ligeiramente modificado. Foram empregadas as seguintes drogas: sulfadiazina, hetacilina, estreptomicina, canamicina, gentamicina, tetraciclina e cloranfenicol. Para cada droga, as concentrações estudadas variaram de 0,5 a 1.000 μ g/ml de meio e para o preparo das soluções procedeu-se conforme recomendado por aquela autora.

As placas foram sempre preparadas no dia do uso, utilizando-se como meio básico agar

(Difco) Mueller-Hinton. Em cada placa foram estudadas 21 amostras, semeadas com uma multi-alça ($\varnothing 2$ mm) a partir do crescimento em BHI, diluído a 1:1000. O controle de viabilidade foi feito em meio sem as drogas e o controle destas, através da semeadura de uma amostra de *E. coli* K12 nos meios contendo estas drogas em concentração mínima (0,5 μ g/ml). As placas foram incubadas a 37°C por 24h, considerando-se como nível de resistência a uma determinada droga, aquela concentração da mesma, na qual o crescimento da bactéria foi igual ou superior a 50% daquele obtido nas placas controle.

Resultados

Os resultados das provas de hemaglutinação passiva, realizadas com antisoros padrão frente a hemácias sensibilizadas com extratos homólogos e heterólogos obtidos a partir de amostras padrão, se acham representados na Tabela 1. Nas reações homólogas os títulos variaram entre 1:512 e 1:1024. Nas reações heterólogas foram observados alguns títulos baixos, compreendidos entre 1:4 e 1:8, ou as reações foram negativas.

Todas as amostras, independentemente da espécie animal considerada (coelhos e aves), comportaram-se como pertencentes ao tipo sorológico A (Tabela 2). Os resultados dos testes de aglutinação somática revelaram uma predominância significativa do sorogrupo 3, entre amostras isoladas de coelhos. Assim sendo, entre 27 amostras oriundas desta espécie animal 25 pertenceram a este sorogrupo, sendo as duas restantes identificadas como sorogrupo 9. Entre as isoladas de aves a variação de sorogrupos foi maior, encontrando-se 4 amostras pertencentes ao sorogrupo 3, uma ao 5, uma ao 7 e finalmente uma ao 8. Ainda que o número de amostras isoladas de aves tenha sido menor, percebe-se ter havido, também, uma maior freqüência do sorogrupo 3 em relação aos demais (Tabela 2).

Tabela 1 — Resultados obtidos nas provas de hemaglutinação passiva realizadas com extrato e antisoros padrão em reações homólogas e heterólogas

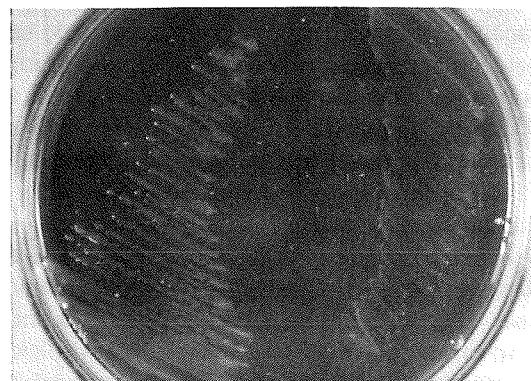
Extratos padrões	Concentração (μ g/ml) de polissacarídeos	Diluição usada na sensibilização das hemácias	Antisoros			
			A	B	D	E
A	4.000	1:40	1/512	1/4	1/4	1/4
B	80	1:2	—	1/512	—	—
D	500	1:5	—	1/8	1/512	1/8
E	500	1:5	—	1/4	1/8	1/1024

Tabela 2 — Características sorológicas das amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em São Paulo, SP

Origem das amostras	Sorotipos		Número de amostras (%)
	antígeno capsular	antígeno somático	
coelho	A	3	25 (73.52)
	A	9	2 (5.88)
	A	3	4 (11.76)
	A	5	1 (2.94)
	A	7	1 (2.94)
	A	8	1 (2.94)

O crescimento mucóide característico das amostras de *P. multocida* do tipo A, desapareceu completamente quando a semeadura das mesmas foi feita em meio de cultura previamente tratado com hialuronidase (Fig. 1).

Figura 1 — Lado esquerdo (A) — Cultura de *Pasteurella multocida* tipo A, em ágar-sangue, incubada a 37°C por 48 horas. Lado direito (B) — Cultura de *Pasteurella multocida*, no mesmo meio, sobre o qual foi espalhado 0.1ml de hialuronidase contendo 500URT (unidades redutoras de turvação). Note-se o desaparecimento do aspecto mucóide do crescimento no lado B da placa de Petri



Com relação aos testes de sensibilidade a drogas os níveis de concentração inibitória mínima (CIM) para a sulfadiazina foram mais elevados do que para as demais drogas estudadas, variando entre 2 e 100 μ g/ml da droga, a maior concentração de sulfadiazina para a qual ainda foram encontradas amostras resistentes (Tabela 3).

Tabela 3 — Concentrações inibitórias de sulfadiazina, cloranfenicol, gentamicina, hetacilina, tetraciclina, estreptomicina e canamicina para amostras de *Pasteurella multocida* isoladas em São Paulo

Droga	Concentração Inibitória mínima ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Amostras	
		N. ^o	%
sulfadiazina	2	3	8.82
	5	10	29.41
	10	2	5.58
	20	6	17.64
	50	8	23.52
	100	5	14.70
	200	0	0
cloranfenicol	1	33	97.05
	2	1	2.95
gentamicina	1	16	47.05
	2	18	52.95
hetacilina	1	28	82.35
	2	6	17.64
tetraciclina	1	32	94.11
	2	2	5.88
estreptomicina	1	11	32.35
	2	0	0
	5	23	67.64
	10	0	0
canamicina	1	18	52.94
	2	5	14.70
	5	11	32.35

Discussão

A prova de hemaglutinação passiva realizada com antígenos extraídos pela hialuronidase revelou que todas as amostras de *P. multocida* estudadas se comportaram como pertencentes ao tipo A de Carter. No que concerne as amostras isoladas de aves, este tipo tem sido descrito com bastante freqüência (14), porém em relação a coelhos, são poucos os dados encontrados na literatura consultada. Exceção feita a Carter & Bain (7) que descreveram este tipo sorológico como predominante nos casos de pasteurelose em coelhos, a quase totalidade dos trabalhos sobre a doença nestes animais tem se limitado em verificar as características da moléstia quanto a fatores predisponentes e medidas gerais de profilaxia. Em outras palavras, os aspectos sorológicos das amostras de *P. multocida* envolvidas na pasteurelose dos coelhos não tem sido suficientemente investigados e apesar dos testes de hemaglutinação passiva, utilizados na classificação dos tipos sorológicos A, B, D e E, já terem sido descritos há bastante

tempo, ao que nos consta, este foi o primeiro estudo que se fez neste sentido no Brasil.

Os resultados da classificação sorológica quanto aos抗ígenos somáticos revelou alguns dados interessantes. Em relação aos sorogrupo isolados de aves ou sejam 3, 5, 7 e 8, apenas os sorogrupo 5 e 8 têm sido descritos como envolvidos na cólera aviária (14). Curiosamente, das 7 amostras de aves por nós estudadas 4 foram classificadas como sorogrupo 3, que segundo Namioka (14) não seria patogênico para estes animais. Salienta-se, entretanto, que todas as amostras de origem aviária foram isoladas de aves que haviam sido acometidas por um surto de pasteurelose, que praticamente dizimou a criação mantida pela Prefeitura Municipal de São Paulo. Este fato, em nossa opinião, sugere uma possível exceção e requer novos estudos para se estabelecer se realmente o sorogrupo 3 de *P. multocida* do tipo A não seria patogênico para aves. Idênticas considerações poderiam ser feitas em relação a sorogrupo 7 identificado por nós e que segundo aquele autor não seria também patogênico para aves.

No que concerne as amostras isoladas de coelhos, houve uma predominância acentuada do sorogrupo 3, identificado em 25 amostras, sendo as duas restantes classificadas como sorogrupo 9.

Vários aspectos estão aparentes nestes resultados. Primeiramente, lembramos que os animais com as lesões descritas e das quais foram isoladas as amostras de *P. multocida* eram provenientes de várias criações, eliminando portanto a possibilidade de que os casos examinados tivessem uma fonte de infecção comum. Em segundo lugar, é evidente que a diversidade de sorogrupo encontrados entre as amostras de origem aviária foi bem maior do que aquela observada para as amostras isoladas de coelhos. Esta variação torna-se ainda mais significativa se atentarmos para o número de amostras examinadas em cada caso, isto é, 27 coelhos e apenas 7 aves. Embora não tenhamos encontrado na literatura menção sobre os sorogrupo que ocorrem em coelhos, o fato de termos isolado, de lesões fechadas nestes animais, amostras do sorogrupo 3 com maior freqüência, não deixa dúvidas quanto ao possível papel desempenhado pelas mesmas nos processos pneumônicos observados.

A par de nossos estudos com relação a identificação sorológica de *P. multocida* terem fornecido subsídios para se criar uma infraestrutura para este tipo de investigação, queremos ressaltar ser extremamente importante, para fins

de vacinação profilática, que se conheça a constituição antigênica de amostras de *P. multocida* mais freqüentes entre nós. Sabe-se, atualmente, que não só o antígeno capsular, como também o antígeno somático, estão envolvidos na formação de anticorpos protetores (14). Em se conhecendo a freqüência dos sorotipos de *P. multocida* em cada Estado ou região, para determinada espécie animal, pode-se idealizar vacinas que visem proteger o maior número possível de animais. Assim sendo, para exemplificar, no caso particular dos coelhos poder-se-ia vaciná-los com os sorotipos A3 e A9. No caso das aves o problema será mais complexo e necessitaria, evidentemente, estudos adicionais.

Os achados relativos à utilização da hialuronidase adicionada ao meio de cultura, para inibir a incorporação de ácido hialurônico à capsula, foram interessantes e sugerem ser possível a identificação presuntiva do tipo A. Em virtude do produto utilizado poder ser adquirido comercialmente, dispensando a montagem de técnicas sorológicas nem sempre ao alcance de laboratórios mais modestos, achamos que o teste proposto apresenta utilidade prática. Esta será mais relevante se lembrarmos que o tipo sorológico em questão parece estar bem difundido entre nós, como atestam os dados relativos

às amostras de *P. multocida* isoladas de coelhos e aves. As amostras por nós estudadas exceptuando-se o comportamento frente a sulphonamida, foram altamente sensíveis aos antibióticos estudados. Apesar da alta distribuição em nosso meio, de fatores R, mormente entre enterobactérias, os baixos níveis de resistência encontrados para os vários antibióticos sugerem que esse tipo de plasmídio não se disseminam facilmente para *P. multocida*. A transmissão desta resistência inter-espécies tem sido demonstrada entre outros gêneros (12), mas no caso em questão, parece não ocorrer apesar do habitat destes microrganismos propiciarem condições para tal.

Outra consideração em relação a sensibilidade de drogas seria de natureza prática, pois, em virtude de alta sensibilidade do microrganismo aos antibióticos estudados, poder-se-ia estabelecer um esquema terapêutico apropriado no combate a doenças causadas por esta bactéria.

Agradecimentos

Agradecemos aos laboratórios Lepetit e Laborterapica Bristol pelo fornecimento, respectivamente, da hialuronidase e das drogas utilizadas nos testes de sensibilidade.

Referências Bibliográficas

- Bier, O. — Bacteriologia e imunologia. 18^a ed. Melhoramentos, 1977.
- Carter, G.R. — The type specific capsular antigen of *P. multocida*. Canada J. Med. Sci., 30:48-53, 1952.
- Carter, G.R. — Studies on *Pasteurella multocida*. I — A hemagglutination test for the identification of serological types. Amer. J. Vet. Res., 16:481-484, 1955.
- Carter, G.R. — A new serological type of *Pasteurella multocida* from central Africa. Vet. Res., 73:1052, 1961.
- Carter, G.R. — Proposed modification of the serological classification of *Pasteurella multocida*. Vet. Res., 75:1264, 1963.
- Carter, G.R. — Improved hemagglutination test for identifying type A strains of *Pasteurella multocida*. Appl. Microbiol., 24:162-163, 1972.
- Carter, G.R. & Bain, R.V.S. — Pasteurellosis (*Pasteurella* — *multocida*): a review stressing recent developments. Vet. Rev. Annot., 6:105-128, 1960.
- Carter, G.R. & Rundell, S.W. — Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. Vet. Rec., 87:343, 1975.
- Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rebers, P.A. & Smith, F. — Phenol-sulfuric acid reaction, 1956. In: — Williams, C.A. & Chase, M.W. — Methods in immunology and immunochemistry. New York/London, Academic Press, 1968.
- Fernandes, M.R.F. — Resistência infecciosa a drogas em culturas de *Shigella*. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1968. (Tese de Doutoramento).
- Giorgi, W.; Castro, A.F.P. & Ribeiro, W.B. — Surto epizootico de pasteurelose em coelhos. Arq. Inst. Biol., 32:81-88, 1965.
- Hayes, W. — The genetics of bacteria and their viruses. 2^a ed. Blackwell Scientific Publications, 1965.
- Karlsson, K.A. & Nyström, K.G. — In vitro sensitivity of bovine and porcine strains of *Pasteurella multocida* to antibiotics. Acta vet. Scand., 3:226-234, 1962.
- Namioka, S. — Antigenic analysis of *Pasteurella multocida*. Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart., 10(Suppl):97-108, 1970.
- Namioka, S. & Murata, M. — Serological studies on *Pasteurella multocida*. II — Characteristic of somatic (O) antigen of the organism. Cornell Vet., 51:507-521, 1970.
- Perreau, P. — La serotypie de *Pasteurella multocida*. Bull. Ass. Vét. Microbiol., 1:25-37, 1967.
- Roberts, R.S. — An immunological study of *Pasteurella septica*. Jour. Comp. Path. Ther., 57:261-278, 1947.
- Trabulsi, L.R. — Aspectos médicos de resistência bacteriana a drogas. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 4(Supl.):1-29, 1973.

Isolamento e estudo de *Candida albicans* e actinomicetos encontrados na cavidade oral de crianças

Eva Miranda de Souza
 Débora Maria Massa Lima
 Maria Dulcinéia Guedes Cavalcanti
 & Maviael José dos Santos
*Dept.^o Micologia do Centro de Ciências
 Biológicas da UFPE,
 50000 Recife PE, Brasil*

Resumo

Em material colhido na cavidade oral de 400 crianças na faixa etária de 7 a 14 anos, foi isolado 17% de *Candida albicans* e 1,75% de actinomicetos pertencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora*. Os indivíduos estudados foram divididos em 3 grupos: (a) crianças com mucosa oral e dentes saudáveis (controle); (b) portadoras de alterações gengivais; (c) portadoras de cáries dentárias. Neste trabalho, procurou-se relacionar a presença de *Candida albicans* e actinomicetos com o pH bucal idade dos pacientes. Os autores, entre outros achados, obtiveram maior incidência de *C. albicans* em crianças com pH 6,0 e idade de 8 anos.

Summary

Isolation and study of Candida albicans and Actinomycetes in oral cavity

In material collected from the oral cavity of 400 children from 7 to 14 years old, it was isolated 17% of *Candida albicans* and 1,75% of Actinomycetes from the following genera: *Streptomyces*, *Nocardia* and *Micromonospora*. The studied individuals were divided in 3 groups: (a) children with healthy oral tissues and teeth (Control); (b) children with gingival alterations; (c) children with dental caries. In this work we tried to relate the occurrence of *C. albicans* and Actinomycetes with the oral pH, and the patients'age. Some authors, among others consulted, found more incidence of *C. albicans* in children with oral pH value of 6 and 8 years old.

Introdução

Candida albicans é saprófita habitual das mucosas, particularmente do intestino e da cavidade bucal. Esta levedura ocasionalmente se torna patogênica em consequência de fatores predisponentes apresentados pelo hospedeiro. Endocrinopatias, certos medicamentos, notadamente o uso indiscriminado de antibióticos e distúrbios, são fatores que contribuem para implanção de certas leveduras e bactérias, ocorrendo a proliferação destes microrganismos, os quais se mostram com virulência variável.

No fim do século passado, Miller (16) foi um dos primeiros a estudar mais profundamente a ação exercida pela flora microbiana da boca e sua possível participação na etiologia das afecções da cavidade bucal.

Santos (20) realizando pesquisa em saliva de 27 alunos de Odontologia de Porto Alegre, com

boca clinicamente sã, após 2 horas de desjejum, detectou a presença de 40,7% do gênero *Candida*, dos quais, 7,4% pertencia à espécie *C. albicans*. O meio de corn-meal-agar, foi usado para verificação da presença de clamidospores, estruturas típicas da espécie.

Gutiérrez (8) detectou 14,7% de levedura em canais radiculares, sendo 74% para *C. albicans*, e 26% para outras espécies do gênero *Candida*.

Tommasi (23) efetuando estudos de leveduras em canais radiculares, e sua respectiva remoção através de métodos biomecânicos, em 193 pacientes, dos quais foram tratados 226 dentes, encontrou um percentual de 26,1% destes microrganismos. Dentre as leveduras isoladas da cavidade bucal e dos canais radiculares, foi encontrado um percentual de *C. albicans* de 73,5% e 86,4%, respectivamente.

A importância de *C. albicans* na saliva segundo Lacaz (12) deve-se a presença de certos fa-

tores que favorecem a patogenicidade nas lesões detectadas clinicamente. Em pesquisas realizadas na boca de recém-nascidos e de adultos, verificou a presença desta levedura, sem qualquer alteração das mucosas.

Charifker (4) correlacionou a presença e proporção de *C. albicans* na saliva de 200 pacientes adultos, na faixa etária de 16 a 74 anos, utilizando "swabs" para a coleta das amostras, obtendo os seguintes resultados: 47 culturas positivas para leveduras, representando 23,5% de positividade, encontrando 8,0% para *C. albicans*, sendo 4,5% no sexo masculino e 12,2% no sexo feminino. Com relação à idade, observou a presença de 11,3% para *C. albicans* em pacientes na faixa etária de 16 a 26 anos.

Young & col. (25) verificaram que quanto mais baixo o pH da saliva, maior a freqüência de leveduras na cavidade bucal, chegando a isolar mais de 90% de casos positivos para o gênero *Candida*.

Passos (19) examinando 500 pacientes na cidade do Recife, portadores de cárie dentária, encontrou 25,6% de positividade para fungos leveduriformes. Devido ao consumo excessivo de açucarados, por parte dos pacientes, admitiu ser este percentual bastante expressivo. Constatou a predominância do gênero *Candida* em 23%, sendo 9,6% para a espécie *C. albicans*.

Schmitt (21) usando a técnica do bochecho, em 103 voluntários, na Universidade de Oklahoma, encontrou 37,8% de casos positivos para *C. albicans*, sendo que, 34,9% foi isolado de cárries dentária. Quanto à idade, detectou 44% de *C. albicans* na faixa etária de 8 a 17 anos.

Hodson (9) estudando a incidência de microrganismos leveduriformes isolados da superfície dos dentes e cárries, num grupo de crianças de 7 meses a 14 anos, obteve 56% de positividade e, em 90% das cárries dentárias isolou *C. albicans*. Observou também, relação bem maior entre a presença deste fungo e as cárries na face labial dos dentes, do que entre estas, e o hábito de consumir balas e pirulitos, além de outros fatores predisponentes.

Ressaltamos ainda a importância dos actinomicetos na cavidade bucal, através de estudos realizados por pesquisadores, tais como: Grossman (7), Miller (16) Skinner (22), Jawetz (11) e Gutiérrez (8), entre outros, relacionando-os ou não com a cárie dentária.

Charifker (5) cita que *Actinomyces israeli* (Kruse) Lacheer-Sandoval, tem sido apontado como agente mais comum de actinomicoses humanas, inclusive de cárries dentária e tumor

retromaxilar. Esta espécie é encontrada com relativa freqüência na cavidade bucal do homem, encrustado em cálculos gengivais e salivares, podendo invadir a mucosa oral ou outras regiões, após traumas, iniciando nos tecidos a formação de lesões. Este autor, ao realizar pesquisas relacionadas com a participação de espécies de *Streptomyces* na patologia da boca, observou que estes microrganismos podem eventualmente, tornar-se patógenos facultativos ou acidentais, dependendo da resistência orgânica do hospedeiro. Foi demonstrado que *S. edaphicus* Charifker n.sp. era potencialmente capaz de produzir paradontopatias em cobaios e, por extensão, no homem, desde que encontre condições propícias ao seu desenvolvimento.

Howell & col. (10) estudando mais de 200 cepas isoladas da cavidade oral, verificaram a ocorrência de *Actinomyces* e anaeróbios facultativos.

Grossman (7), Gutiérrez (8), Orban (18) e outros, através de pesquisas realizadas em dentes humanos, evidenciaram a capacidade das bactérias de penetrarem no interior dos canalículos de Tomes, o mesmo não ocorrendo com as células fúngicas, pois segundo Gutiérrez (8), estes possuem diâmetro maior do que o dos canalículos dentinários.

Neste trabalho, procurou-se investigar a incidência de *C. albicans* e actinomicetos na cavidade oral das crianças na faixa etária de 7 a 14 anos, com dentição mista, que consumiam excessivamente açucarados como balas, chocolates, etc. É do nosso conhecimento que a *C. albicans* assimila e fermenta glicose, sacarose e outros açúcares, justificando deste modo, um maior percentual em relação às crianças com hábito satisfatório de higiene bucal, enfatizando-nos a investigar a incidência de *C. albicans* e actinomicetos, relacionando-os com a presença de alterações gengivais e cárries dentárias das crianças na faixa etária já mencionada.

Material e Métodos

A coleta de material, foi efetuada em estabelecimentos escolares oficiais, em diversos bairros da cidade do Recife. Coletou-se material da região bucal de 400 crianças de ambos os sexos, na faixa etária de 7 a 14 anos, escolhidas aleatoriamente, tomando-se os parâmetros arbitrários de 95% de probabilidade e $\pm 5\%$ de fidelidade, segundo Askin & Colton (1), para estabelecer o tamanho de amostra.

Critérios usados — Considerou-se três grupos, de acordo com o estado bucal de cada indivíduo:

- a) crianças portadoras de cáries dentária;
- b) crianças com alterações gengivais e sem cáries dentária;
- c) crianças portadoras de boca clinicamente sã, isto é, com mucosa oral e dentes saudáveis, que serviu como grupo controle.

Segundo Baer & Benjamim (2), durante a infância e a puberdade, o periodonto está em constante estado de mudança devido a esfoliação e erupção dos dentes, tornando-se difícil a descrição do periodonto normal que varia com a idade do paciente. Como nossa amostra foi representada por crianças na faixa etária de 7 a 14 anos, preferimos seguir a orientação de Zappeler (26) que apresenta uma descrição geral do periodonto juvenil, enumerando as seguintes características de normalidade:

- 1 — Gengiva mais rosada, devido a um epitélio mais delgado e menos cornificado, tendo mais vascularização;
- 2 — Ausência de pontilhado, devido a que as papilas conjuntivas da lámina própria são mais curtas e planas;
- 3 — Mais flácidas em razão da menor densidade do tecido conjuntivo da lámina própria;
- 4 — Margens arredondadas originadas pela hiperemia e o edema que acompanha a erupção;
- 5 — Maior profundidade do sulco, facilidade relativa de retração gengival.

As crianças fora destas características de normalidade foram consideradas portadoras de alterações gengivais; sendo que, para nossa pesquisa, não foi necessário nos deter quanto a intensidade dessas alterações.

O pH bucal de todos os indivíduos foi detectado antes de coletar o material, usando o papel indicador universal Merck, obedecendo o seguinte critério: 1 — colocar a fita no dorso da língua da criança, deixando-o permanecer neste local durante 1 minuto e, em seguida, retirar com uma pinça e comparar com a escala padronizada, determinando assim o grau de acidez ou alcalinidade da boca de cada indivíduo.

O material dos sulcos gengivais e das cavidades formadas pelas cáries, foi colhido utilizando-se uma pequena mecha de algodão adaptada a um bastão de madeira e uma cureta de dentina, previamente esterilizados.

As crianças foram divididas em três grupos:

Grupo A — Nas crianças com boca clinicamente sã, a coleta foi feita nos sulcos gengivais dos quatro primeiros molares permanentes e, na ausência destes, os segundos molares.

Grupo B — Nas crianças com alterações gengivais e sem cárie dentária, a coleta foi realizada em elementos dentários que possuam este tipo de lesão.

Grupo C — Nas crianças portadoras de cárie dentária, a coleta foi realizada com cureta de dentina (Tenax nº 5), recolhendo-se o material existente na camada mais profunda da cavidade. Em seguida, o material foi colocado em tubos de hemólise contendo 2ml de solução de Ringer, à temperatura ambiente. Este material foi centrifugado a 500rpm, durante 3 minutos, e o sedimento transferido para meios artificiais de cultivo específicos para leveduras (Sabouraud-dextrose-ágar + antibiótico) a actinomicetos (Czapek).

Identificação dos microrganismos — As colônias isoladas foram identificadas por suas características morfológicas e bioquímicas. Para a identificação específica das leveduras, foram usados os seguintes meios artificiais de cultivo: Sabouraud-dextrose-ágar, malte-ágar, extrato de malte, água peptonada + bile de boi, água peptonada com indicador Andrade; batata-dextrose-ágar, corn-meal-ágar, meio "C" para auxanograma dos açúcares (G. Gal., S., M., L.) e meio "N" para auxanograma do Nitrogênio contido nos cristais de nitrato de potássio (KNO_3) e sulfato de amônia $(NH_4)_2SO_4$. O meio água de batata com bile de boi, o corn-meal-ágar e a técnica de "cultura em lámina" com meio de batata-dextrose-ágar, serviram para observação de clamidosporos e tipo de filamento. Sendo as espécies *C. albicans* e *C. stellatoidea*, capazes de produzir clamidosporos, tanto em água de batata com bile de boi, como em batata-dextrose-ágar e corn-meal-ágar, fez-se necessário o uso de provas bioquímicas, principalmente o auxanograma. De acordo com Lodder (15) a *C. albicans* assimila glicose, galactose, sacarose e maltose e a *C. stellatoidea*, assimila todos os açúcares acima mencionados, menos a sacarose.

Prova de assimilação de açúcares, segundo Lodder (15).

C. albicans

glicose +
galactose +
sacarose +
maltose +
lactose -

C. stellatoidea

glicose +
galactose +
sacarose -
maltose +
lactose -

As técnicas utilizadas foram as preconizadas por Batista & col., indicadas por Lima (13, 14), as quais, são uma simplificação da classificação adotada por Lodder (15).

Para estudo cultural, morfológico e bioquímico dos actinomicetos, foram utilizados meios de uso corrente, de acordo com o Committee on Bacteriological Technic (6), Waksman (25) e Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (3).

Resultados

A distribuição de *C. albicans*, isolada das 400 amostras estudadas, levando-se em consideração idade e sexo, está expressa na Tabela 1.

A Tabela 2, mostra que a maioria das crianças apresentou o pH bucal 7,0 (39,20%), seguindo-se de 25,00% com o pH bucal 6,0.

Tabela 1 — Distribuição das 400 amostras estudadas

Idade	Bocas Clinicamente sãs		Bocas com alterações gengivais		Bocas com cárries dentárias		Totais		Percentagem	
	Sexo		Sexo		Sexo		Sexo			
	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.		
7 Anos	7	7	7	7	6	6	20	20	10,00%	
8 Anos	8	9	9	8	9	9	26	26	13,00%	
9 Anos	9	8	9	9	8	9	26	26	13,00%	
10 Anos	9	9	8	9	9	8	26	26	13,00%	
11 Anos	10	9	8	10	10	9	28	28	14,00%	
12 Anos	7	8	8	9	9	7	24	24	12,00%	
13 Anos	8	9	9	10	9	7	26	26	13,00%	
14 Anos	8	8	8	8	8	8	24	24	12,00%	
Total	66	67	66	70	68	63	200	200	100,00%	

Tabela 2 — Relação do pH bucal das crianças examinadas do grupo etário de 7-14 anos por idade e sexo da cidade do Recife, PE

Ph Bucal	Idade	7 Anos		8 Anos		9 Anos		10 Anos		11 Anos		12 Anos		13 Anos		14 Anos		Total	Percentagem
		Sexo	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	
6.0		3	6	5	6	7	6	6	7	10	8	3	5	5	9	6	8	100	25,00%
...																			
6.5	-	-	-	-	-	-	2	-	-	1	1	1	3	-	1	1	-	10	2,50%
6.6		5	3	10	10	6	8	10	7	6	5	3	4	2	3	3	2	90	22,50%
6.7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	0,25%
6.8		2	2	-	-	1	-	-	-	6	5	5	7	3	5	4	2	42	10,50%
...																			
7.0		10	8	9	10	8	11	10	11	4	8	13	6	17	8	12	12	157	39,25%
Total		20	19	24	26	25	27	26	25	27	27	25	25	27	26	26	25	400	100,00%

Tabela 3 — Prevalência de *Candida albicans*, segundo o pH bucal das crianças da faixa etária de 7-14 Anos, Recife, PE

pH Bucal	Número de casos	Casos positivos para <i>Candida albicans</i>	
		Absolutos	Percentagem
6.0	100	22	22,00%
...			
6.5	10		
6.6	90	17	18,80%
6.7	01		
6.8	42	1	2,37%
...			
7.0	157	28	17,80%
Total	400	68	17,00%

Tabela 4 — Prevalência de *Candida albicans*, segundo a idade, sexo e estado bucal das crianças da cidade do Recife, PE

Idade	Número de pacientes		Bocas clinicamente sãs		Alterações gengivais		Cáries dentárias		Total	Percentagem		
	Sexo											
	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.	Masc.	Fem				
7 Anos	20	20	2	—	1	—	1	2	6	15,00%		
8 Anos	26	26	1	2	3	—	2	5	13	25,00%		
9 Anos	26	26	1	1	5	1	4	4	16	3,76%		
10 Anos	26	26	—	2	4	—	11	1	18	3,20%		
11 Anos	28	28	—	—	3	—	2	2	7	12,50%		
12 Anos	24	24	—	—	—	1	2	1	4	8,33%		
13 Anos	26	26	—	—	1	1	—	—	2	3,84%		
14 Anos	24	24	—	—	—	1	1	—	2	4,16%		
Total	200	200	4	5	17	4	23	15	68	17,00%		

Maior incidência de *C. albicans* foi verificada em pacientes que apresentaram o pH ácido (6.0) (Tabela 3).

Das 400 amostras colhidas de crianças portadoras de boca clinicamente sã, com alterações gengivais e cáries dentária, foram isoladas 68 cepas de *C. albicans* (17,00%) e 7 cepas per-

tencentes aos gêneros *Streptomyces*, *Nocardia* e *Micromonospora* (Tabela 5 e 6).

Maior percentual de *C. albicans*, 15,00% e 25,00%, foi encontrado nas crianças com 7 e 8 anos respectivamente, todas apresentando alterações gengivais, seguindo-se de 12,00% naquelas com 11 anos de idade (Tabela 4).

Tabela 5 — Resultado global da prevalência de *Candida albicans* em relação com o estado bucal e sexo das crianças na faixa etária de 7-14 anos da cidade do Recife, PE

Local	Número de exames		Total	Casos positivos da <i>Candida albicans</i>		
	Sexo			Absolutos	Percentagem	
	Masc.	Fem.				
Bocas clinicamente sãs	66	67	133	22	15,78%	
Bocas com alterações gengivais	66	70	136	38	28,35%	
Bocas com cárries dentárias	68	63	131	8	6,10%	
Total	200	200	400	68	17,00%	

Tabela 6 — Prevalência de *Candida albicans* e actinomicetos nas 400 amostras estudadas

Microrganismos	Total	Percentual
<i>Candida albicans</i>	66	17,00%
<i>Streptomyces annulatus</i>	1	0,25%
<i>Streptomyces virgatus</i>	1	0,25%
<i>Streptomyces albus</i>	1	0,25%
<i>Streptomyces calvus</i>	1	0,25%
<i>Streptomyces diastaticus</i>	1	0,25%
<i>Micromonospora chalcea</i>	1	0,25%
<i>Nocardia</i> sp.	1	0,25%

Discussão

Levantamentos epidemiológicos para estabelecer a incidência de fungos leveduriformes e actinomicetos, na cavidade bucal, têm sido realizados em diversos países (2, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 17, 22, 25). No Brasil, na cidade do Recife, Charifker (4) trabalhando com fungos leveduriformes isolados do líquido bucal de adultos, na faixa etária de 16-74 anos, assinalou a presença de 8,00% de *C. albicans*, além de outras leveduras. Este mesmo autor em 1965, em pesquisas realizadas sobre “streptomyces

Waksman & Henrici e parodontoses”, verificou a participação de *Streptomyces* spp. na patologia da cavidade oral, tendo isolado *S. edaphicus* do solo e posteriormente inoculado em coelhos, observando a produção de reação inflamatória, do tipo agudo, no parodonto ao nível do colo dentário, obtendo retrocultivo após ter sido realizada necropsia.

Passos (19) examinando 500 pacientes portadores de cárries dentária, detectou 9,60% de *C. albicans*, além de 23,00% de positividade para o gênero *Candida*. O resultado por Passos (19), 9,60% muito se aproximou com os de Charifker

(4), 8,00%, quanto à espécie *C. albicans*. Supomos ser este fato devido a esta pesquisa ter sido realizada na mesma cidade, vivendo os pacientes, os problemas sócio-econômicos e de higiene.

Santos (20) pesquisando fungos em saliva de estudantes universitários (Porto Alegre) com boca clinicamente sã, após 2 horas de desjejum, encontrou percentuais aproximados aos de Charifker (4) e Passos (19), para a espécie *C. albicans* (7,40%), apesar de tratar-se de adultos, com grau universitário, estudantes de Odontologia e vasta noção de higiene bucal; detectou ainda 40,70% de leveduras do gênero *Candida*.

Tomasi (23) isolou *C. albicans* de canais radiculares (86,40%) através de métodos biomecânicos e da cavidade oral (73,50%) utilizando saliva colhida do dorso da língua (região posterior) e, também no espaço retro-molar.

Os resultados por nós obtidos (6,10%) em pacientes portadores de cárries dentária, se aproximaram dos encontrados por Passos (19), 9,60%, o mesmo não acontecendo em relação com os resultados obtidos por Tomasi (23), (73,50% para *C. albicans*, em saliva) uma vez que, detectamos 15,78% para este microorganismo em indivíduos portadores de boca clinicamente sadia.

O maior percentual de *C. albicans* por nós encontrado foi em indivíduos portadores de alterações gengivais, (28,35%) bastante inferior aos encontrados por Gutiérrez (8), 74,00% e Tomasi (23), 86,40% em canais radiculares.

Apesar da maioria das crianças examinadas ter apresentado pH bucal 7.0 (39,25%), maior incidência de *C. albicans* (22,00%) verificou-se nos indivíduos com pH bucal ácido (6.0), no que concordamos com Young & col. (25), quando verificaram que quanto mais baixo o pH salivar, maior a freqüência de leveduras na

cavidade bucal, havendo detectado na saliva 90,00% para o gênero *Candida*.

Nos indivíduos da faixa de 7 a 14 anos, maior percentual foi encontrado em crianças com 8 anos (25,00%), seguindo-se as crianças com 7 anos de idade (15,00%). Em faixas etárias maiores, houve um decréscimo no aparecimento de *C. albicans*, tudo indicando terem sido mais orientadas quanto à importância da higiene bucal.

Em indivíduos portadores de alterações gengivais foram encontrados 28,35% de *C. albicans*.

O isolamento de 1,75% de actinomicetos, sendo 0,25% para cada espécie dectada, a saber: *Streptomyces annulatus*, *S. virgatus*, *S. albus*, *S. calvus*, *S. diastaticus*, *Micromonospora chalcea* e *Nocardia* sp., foi insignificante estatisticamente, dada a freqüência com que estes microrganismos são encontrados na cavidade bucal (Tabela 6).

Pelo fato de não se ter conseguido isolar *Actinomyces israeli* e outras espécies do gênero *Candida* da boca dos indivíduos examinados, não significa que estes microrganismos não estivessem presentes na cavidade oral dos mesmos.

É de nosso conhecimento que o *A. israeli* vive nas cárries dentárias, nas amígdalas e na boca, sob a forma de grãos compactos, com ou sem clavas. Extrações dentárias ou de amígdalas, traumatismos, etc. constituem os principais fatores para a implantação e desenvolvimento deste microrganismo, podendo provocar, actinomicose cérvico-facial e tóraco-pulmonar. De acordo com Negroni (17), os casos mais comuns de actinomicose cefálica, torácica e abdominal, encontrados na Argentina, são geralmente, determinados pelo *A. israeli*, com maior incidência nas regiões urbanas.

Referências Bibliográficas

1. Askin, J. & Colton, M. — Tables in statistics. New York, Baine & Noble, 1960.
2. Baer, P.N. & Benjamin, S.D. — Enfermedad periodontal en niños y adolescentes. Buenos Aires, Editorial Mundial, 1975.
3. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
4. Charifker, M. — Contribuição ao estudo micológico do líquido bucal. Recife, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Recife, 1960. (Tese de Docência Livre).
5. Charifker, M. — *Streptomyces* Waksman & Henrici e parodontoses. Recife, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, 1965. (Tese Cátedra de Microbiologia e Imunologia).
6. Committee on Bacteriological Technic — Manual of microbiological methods. Soc. Amer. Bacteriol. New York, McGraw-Hill Book, 1957.
7. Grossman, L.T. — Evaluation of antifungal agents for endodontic use. J. Dent. Res., 46:215-217, 1967.
8. Gutiérrez, G.J.H. — Acción del nistatin sobre la infección residual en endodontia. Rev. Odont. Concepción, 5:214-217, 1958.

9. Hodson, J.J. & Craig, G.T. — The incidence of *C. albicans* in the plaques of teeth of children. The Dental Practitioner, 22:296-301, 1972.
10. Howell Jr., A.; Stephan, R.M. & Paul, F. — Prevalence of *Actinomyces israeli*, *A. naeslundii*, *Bacterionema matruchotii* and *Candida albicans* in selected areas of the oral cavity and saliva. J. Dent. Res., 41:1050, 1962.
11. Jawetz, E. — Microbiologia médica. 7 ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1968.
12. Lacaz, C.S. — Compêndio de micologia médica. 4 ed. São Paulo, Sarvier, 1967.
13. Lima, J.A. — Micologia: noções elementares; fungos zoopatogênicos, métodos gerais de estudo. Recife, 1968.
14. Lima, J.A. — Leveduras imperfeitas. Recife, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, 1973.
15. Lodder, J. — The yeast. 3 ed. Amsterdam/London, North Holland Pub., 1974.
16. Miller, W.D. — Microorganisms of the mouth. Philadelphia, S.S. White Dental, 1890.
17. Negroni, P. & Bonfiglioli, A. — Morphology and biology of *Actinomycetes israeli* (Kruse, 1896). J.Trop.Med. Hyg., 40:226, 1937.
18. Orban, B. — Migration of leukocytes into the dentinal tubules. J. Amer. Dent. Ass., 27:239-250, 1940.
19. Passos, G.M. — Processos cariáticos micóticos: técnicas de defesa. Recife, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Recife, 1961. (Tese de Docência Livre).
20. Santos, J.O.S. — Presença da *Candida albicans* na saliva. Rev. Gaúcha Odont., 9:80-82, 1961.
21. Schmitt, J.A. — Epidemiological investigations of oral *Candida albicans*. Mycopathol. et Mycol. Appl., 43:65-87, 1971.
22. Sykes, G. & Skinner, F.A. — Actinomycetales characteristics and practical importance. New York, Academic Press, 1973.
23. Tommasi, A.F. — Leveduras em canais radiculares. Rev. Fac. Odont. S. Paulo, 7:363-401, 1969.
24. Waksman, S.A. — The actinomycetes: classification, identification and descriptions of genera and species. Baltimore, Williams & Wilkins, 1961.
25. Young, G.; Resca, H.G. & Sullivan, M.T. — The yeasts of the normal mouth and their relation to salivary acidity. J. Dent. Res., 30:426-470, 1951.
26. Zappler, S.E. — Periodontal disease in children. J.A.D.A., 3:333, 1948.

**Pathotoxins produced in vitro by
Brazilian isolates of
Helminthosporium maydis Nisikado & Miyake***

Vicente de P. Campos

*Escola Superior de Agricultura de Lavras, Caixa Postal 37,
37200 Lavras MG, Brasil*

Daison Olzany Silva

& Murilo G. de Carvalho

*Universidade Federal de Viçosa,
36570 Viçosa MG, Brasil*

Summary

Culture extracts of races T and O from two Brazilian isolates of *Helminthosporium maydis* were studied and effort to understand the nature of the compounds most active in pathogenesis. Through extraction and concentrations with organic solvents, liophylization, acidic hydrolysis of eluate fractions from column chromatograms, and analysis by paper chromatographic methods, at least distinct, biologically active peptides were found associated with the race T isolate, and at least one with the race O isolate. The peptide(s) produced by race T, specifically pathotoxic to male-sterile cytoplasm (maize), came from tube 8 — out of 24 eluate fractions from the Sephadex column — and comprised at least 6 amino-acid residues, and its molecular weight was estimated to be close to 700. The other two peptides, one for each race, were associated with the last column fractions and detected in higher amounts than the race T, pathotoxic one. They showed no effect on two types of maize tested although clearly inhibitory to conidial germination of *Gloeosporium* sp., in a test intend as an additional bioassay.

Resumo

Toxinas fitopatogênicas produzidas in vitro por Helminthosporium maydis isolado no Brasil

Os princípios tóxicos dos filtrados de dois isolamentos respectivamente caracterizados como raça T e O foram concentrados por liofilização, e tentativamente extraídos com clorofórmio e purificados com o uso de metanol e cromatógrafo de coluna. Desenvolvido o extrato da raça T em coluna de Shephadex G10, o bioensaio consistindo de injeções em colmo de milho revelou estar a toxina presente em maior quantidade no tubo 8 do eluato. Nenhum princípio tóxico foi constatado no extrato de raça O concentrado por liofilização por esse bioensaio. À vista, só foi feita a hidrólise ácida do eluato do tubo 8 do cromatógrafo de coluna, raça T, seguindo-se 3 tipos de desenvolvimento em cromatografias de papel, em que se revelaram, por comparação com um padrão, 6 manchas com ninhidrina, 2 identificadas como prolina e tirosina e as demais, como possíveis misturas de aminoácidos. Três bioensaios foram comparados usando-se concentrados das duas raças, resultantes da extração com clorofórmio, e os eluatos obtidos por cromatografia de coluna. Quanto à raça T, os bioensaios de inibição de raízes primárias e injeções em colmos de milho acusaram a presença da toxina no extrato concentrado e, particularmente, nos tubos 7 e 8 do eluato do cromatógrafo de coluna. O teste de inibição da germinação de *Gloeosporium* sp. acusou a presença de princípio tóxico no extrato concentrado e no tubo 19 do eluato do cromatógrafo de coluna o que o torna sem validade para detetar ou quantitativar a(s) substância(s) biologicamente ativas. O extrato concentrado da raça O e os eluatos dos tubos 6 e 7 do cromatógrafo de coluna inibiram o alongamento radicular de sementes de milho em germinação. No entanto, as injeções em colmos de milho não acusaram nenhuma toxidez quer no extrato concentrado, quer nos tubos de eluato do cromatógrafo.

Inibição da germinação dos conídios de *Gloeosporium* sp. ocorreu diante do extrato concentrado desta raça e do eluato no tubo 19.

* Part of a thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of the degree of Master of Science in Agricultural Microbiology at the Universidade Federal de Viçosa. Research sponsored by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Brazil.

Introduction

Southern corn leaf blight has caused serious damage to maize crops, effecting world economy. The disease attacks with special severity Texas male sterile cytoplasm leaves, widely used in commercial seed corn production. Therefore, it is important to investigate aspects of the pathogenicity of the causal agent, *Helminthosporium maydis*, and attempt to isolate and characterize the pathogenic principle.

Hooker & col. (7, 8) named the common and virulent strains of *Helminthosporium maydis* O and T, respectively, and established six criteria to differentiate them: (a) cytoplasmic specificity; (b) pathogenicity; (c) ability or inability to produce compounds toxic to maize; (d) susceptibility of different plant organs to infection; (e) degree of sporulation and (f) temperature conditioning epiphytotics. They proceeded to an investigation of the phytotoxicity of the T race by concentrating and dialyzing culture filtrate and observing the effect of the liquid on germinating seeds of normal and male-sterile cytoplasm. Inhibition of primary root elongation in both types of seedlings was found.

Gracen & col. (4) developed a test for susceptible races of maize by injecting or spraying plants in the field with culture filtrates of the T race. Leaves of sensitive plants became discolored and necrotic. This procedure can also be used as a bioassay for phytotoxicity of culture extracts.

Comstock & Scheffer (3) concentrated race T extract and isolated the toxin by paper and column chromatography.

Lim & col. (9) reported that the race T toxin could be extracted with methanol from PDA culture medium.

Hesseltine & col. (6) found that the race T toxin is a polypeptide of unknown composition and structure. The polypeptide can elicit all symptoms of the disease when applied to plants.

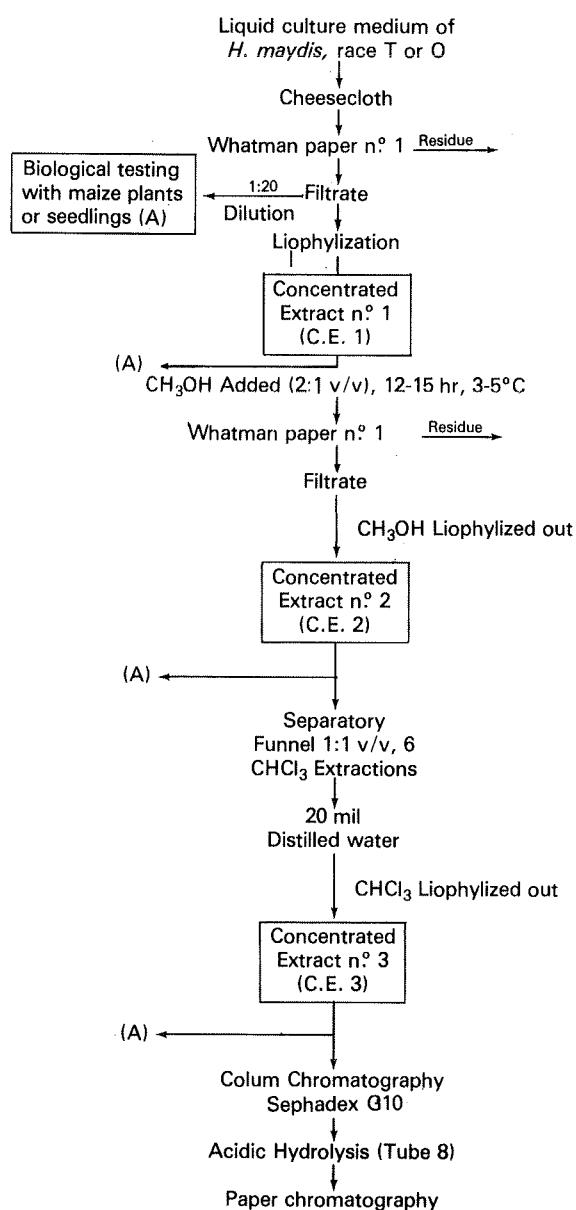
In the present study an attempt has been made to purify and characterize the toxic principles produced in culture by T and O isolates found in two Brazilian States, Espírito Santo and Rio Grande do Sul.

Material and Methods

Purification and analysis of races T and O toxic compounds — Isolates number 4 (race O) and 7 of *H. maydis*, collected in 1973 in Linhares

County, Espírito Santo, and São Gabriel County, Rio Grande do Sul, Brazil, respectively, gave the original monosporic cultures used here (2). Circular blocks from each sporulating, 10-day old culture on PDA were cut with a sterilized cork borer and transferred into the liquid medium described by Hooker & col. (7). Following 15 days at $24 \pm 2^\circ\text{C}$, the mycelium-containing liquid was strained through cheesecloth and filtered through Whatman paper n.º 1. The filtrates were tested for inhibition of root growth.

Figure 1 — Purification and analysis of a pathotoxic peptide produced *in vitro* by *H. maydis*, race T



Both filtrates were taken into porcelain capsules and reduced down to 3.5:1 of the original volume in a Virtis Liophylizer, model 10-145 MR-BA giving concentrated extract n° 1 or c.e.1 (Figure 1). After methanol was added and mixed 2:1 with the c.e.1, the mixture from each isolate was left for 15hrs, at 3-5°C and then filtered through paper. Race T filtrate was concentrated 8:1 and race O filtrate 20:1 through liophylization, producing concentrated extract n° 2 (c.e.2). Biological testing for toxin activity was performed by sampling 2ml out of each c.e.2, diluting samples up to 40ml with distilled water and applying half this volume to ten maize seedlings in Petri dishes. Hypocotyls, initially 5mm long, were measured after incubation for 48hr in the dark at 24 ± 3°C.

By stepwise addition of chloroform (1:1/v:v) to each c.e.2, six consecutive extractions were done in a separatory funnel. Each extract, plus 20ml of distilled water, yielded concentrated extract n° 3 after liophylizing out the chloroform. The volumes in both cases were equalized at 9ml with distilled water and stored at -10°C. Biological activity was checked in both solutions by injecting 0.5ml of each extract into stems of two male-sterile and two normal cytoplasm plants one inch above ground and looking for symptoms four days later.

Next, two milliliters from each c.e.3 were developed with distilled water, at 1.0ml/8 minutes, through a 22 × 1.5cm. G10 Sephadex column, resulting in an eluate made up of 25 fractions, 3ml each. Half a milliliter from each of these fractions was withdrawn for protein analysis according to Lowry & col. (10).

Since symptoms were not observed in maize plants following the injections with each of the race O eluate fractions, the hydrolyses which followed were performed only on the race T fractions that had exhibited biological activity. A sample from tube 8 received 0.5ml (1:1/v:v) of 12NHCl, was autoclaved 1 hr at 120°C, and had the acid evaporated out in a "sand bath" (Brune's method, modified) (1). Half a milliliter was added to the dried residue and developed by the following types of paper chromatography: descending, broken front; bidimensional; and multiple development. Solvents or solvent systems in each development were: Sec. Butanol (BuOH — 3,3% NH₃ — 15:6 (descending) (12); n-BuOH: acetic acid: water — 4:1:1 (first direction) and phenol: 3:3% NH₃ — 3:1 (second direction) (bidimensional); and BuOH: acetic acid: water — 90:10:25, in the multiple

development (12). Control was provided by a 18 amino acid solution run along with each sample, and chromatograms were sprayed with ninhydrin for amino acid detection.

Bioassay methods — To detect biological activity in the *H. maydis* culture extracts at various steps during the purification schedule, several methods were available (5, 7, 8). Some were initially compared and the following three selected to be used at distinct steps.

Inhibition of primary root elongation — Samples of two milliliters from isolate 4 (race O) or isolate 7 (race T) culture filtrates (2), were diluted 1:20 v/v in distilled water and placed in each of two Petri dishes containing either 10 male-sterile cytoplasm maize seedlings or normal cytoplasm seedlings, having roots 5mm long. Root length was measured for inhibition following incubation on a lab bench for 48hr at 18-24°C in the dark. This technique was employed during the purification schedule for both races T and O, to assay for pathotoxic activity in the concentrated extracts or eluate fractions (Figure 1).

Injection into maize stems — Two normal and two male-sterile cytoplasm maize plants, at the 3-5 leaf stage, were infected 2.5cm above the ground (5) with 0.3ml of the undiluted concentrated extract n° 3 derived from each race. As controls, the same number of both types of maize received 0.3ml of distilled water and all plants were kept in the greenhouse for four days, before being checked for symptoms. The same procedure was employed to test 0.5ml samples from each fraction derived by column chromatography (Figure 1) from race O and T concentrated extracts n° 3.

Inhibition of spore germination in *Gloeosporium* sp. — Germination of *Gloeosporium* sp. conidia was homogeneous and nearly complete when sporulation had been carried out in a culture medium prepared by a decoction of bananas (300g/liter for 10min.) and conidia allowed to germinate soon afterwards on glass slides in a humid chamber at 21°C. Germination was inhibited, however, when race T concentrated extracts or definite eluate fractions (column chromatography) were present. Implicit was a bioassay method suitable for routine use thus deserving a comparison with the other two (4, 7). Spores were counted at 150 × magni-

fication, after mixing 0.3ml from every liquid under test with identical volume of a conidial suspension previously adjusted down to a spore count of 150 per microscopic field. After seven hours at $21 \pm 1^\circ\text{C}$, any spore showing a germ tube longer than spore width was credited as germinated.

Results

Tables 1 and 2 show that while the culture filtrate from the race O isolate or its concentrated extracts inhibited root elongation to the same extent in both kinds of cytoplasm, similar products from race T (isolate n° 7) were substantially more inhibitory to male-sterile cytoplasm than to normal cytoplasm. Texas cytoplasm plants, once injected with the aqueous extract obtained through chloroform extraction from isolate 7, exhibited chlorotic lesions which turned into necrotic ones and eventually dried out. Normal cytoplasm plants injected with the same liquids or the corresponding ones obtained from isolate 4 remained macroscopically unchanged.

On injecting 0.5ml sampled from each eluate fraction, the observed symptoms — graded to facilitate the assessment — indicated phytotoxic activity associated only with fractions in tubes 6 through 11 (race T) (Table 3). Distilled

water, used as control, and race O extracts did not elicit perceptible changes in the test plants. The greatest toxin activity was associated with the fraction in tube 8, and its contents were taken for analysis by paper chromatography (Figures 2, 3 and 4).

Figure 2 — Race T: Bidimensional development in paper, tube 8 contents from the column eluate obtained from concentrated extract n° 3. The 18-amino acid standard is not shown

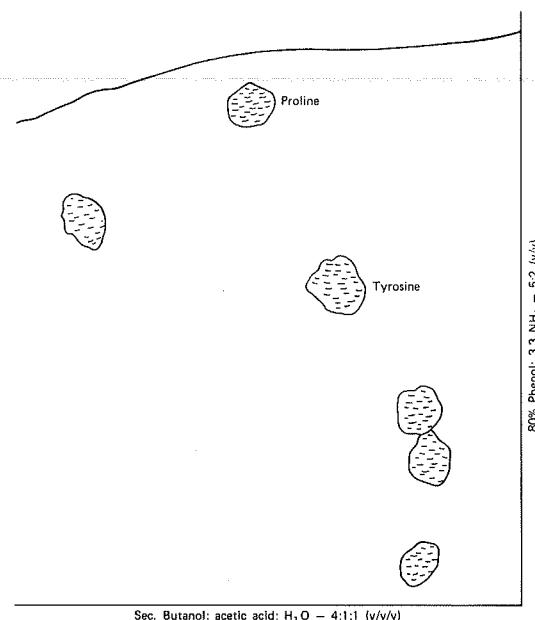


Table 1 — Root elongation in corn seedlings exposed for 48hr to race T or O culture filtrates

Volume reduction of filtrate	Cytoplasm	Isol. 7 (Race T)		Isol. 4 (Race O)		Dist. Water	
		^a Avg(mm)	Range	Avg(mm)	Range	Avg(mm)	Range
None	Male-sterile	^b 2.0	1.0- 3.0	6.8	3.0-10.0	21.8	15.0-32.0
	Normal	19.1	15.0-30.0	6.0	2.0-11.0	19.4	14.0-26.0
3.5:1	Male-sterile	1.5	1.0- 3.0	3.0	1.5- 6.0	25.0	15.5-35.0
	Normal	18.5	10.0-25.0	7.0	2.0-17.0	29.0	12.0-40.0

^aRoot was 5mm long when seedlings was exposed to extract

^bAverage for ten seedlings

Table 2 — Graded symptoms after injecting corn stems with eluate fractions obtained by column chromatography from T concentrated culture filtrates

Corn Cytoplasm	^a Race T, eluate tube n°							
	5 ^b	6	7	8	9	10	11	12
Male-sterile	0 ^c	8	12	24	18	8	3	0
Normal	0	0	0	0	0	0	0	0

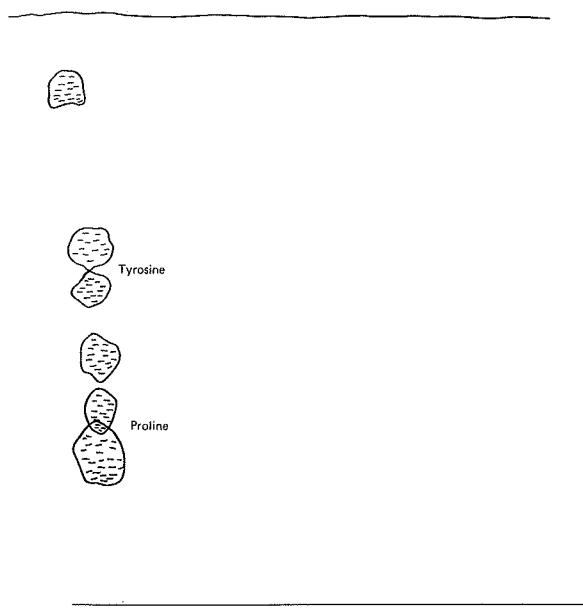
^aNo race O eluate fraction or any control treatment induced morphological changes in the injected maize

^bHalf milliliter from the 3ml eluate fraction was injected per plant

^cFigures result from grading symptoms and by adding them up: 0, symptomless; 1, leaf with one chlorotic streak; 3, leaf showing one necrotic streak; 7, wilted and dried up leaf

Table 3 — Comparison of three bioassays to test biological activity in the lyophilized extracts from race T and O isolates

Bioassay	Race O ^a		Race T	Distilled water
	Average root elongation (mm)			
Root Elongation	Texas	3.5(1.5- 6.0) ^b	1.5(1.0- 3.0)	25.0(15.0-35.0)
	Normal	7.0(2.0-17.0)	18.5(10.0-25.0)	29.0(12.0-40.0)
Pathogenic activity in plants	Symptoms in maize ^c			
	Texas	0.0	19.0	0.0
Inhibition of conidial germination in <i>Gloeosporium</i> sp.	Normal	0.0	0.0	0.0
	Spore Germination (%)			
		1.0	2.0	91.0

^aRace O, isolate 4; race T, n° 7. Root 5mm long at treatment^bAverage of 10 seedlings. Range within parentheses^cSymptoms were graded and added up to yield figures; see Table 2 for explanation**Figure 3** — Race T: Paper chromatogram in paper, tube 8 content derived by column chromatography of the concentrated extract n° 3 amino acid standard not shown, amino acid identifications are tentative

Analysis of each eluate fraction taken from the Sephadex column indicated that inhibition of *Gloeosporium* conidia was the greatest around tube 19 and led to curves showing a similar pattern for either race (Figure 5 and 6). The highest protein dosage was also found in later fractions (Figure 5 and 6). However, root elongation was most strongly affected and symptoms in maize were the most evident when material was treated with the contents of

tube 8 (Figure 6, race T), where protein measured much less than in tube 19. In evaluating which the extracts produced inhibitory effects, the controls were taken for reference as 100.

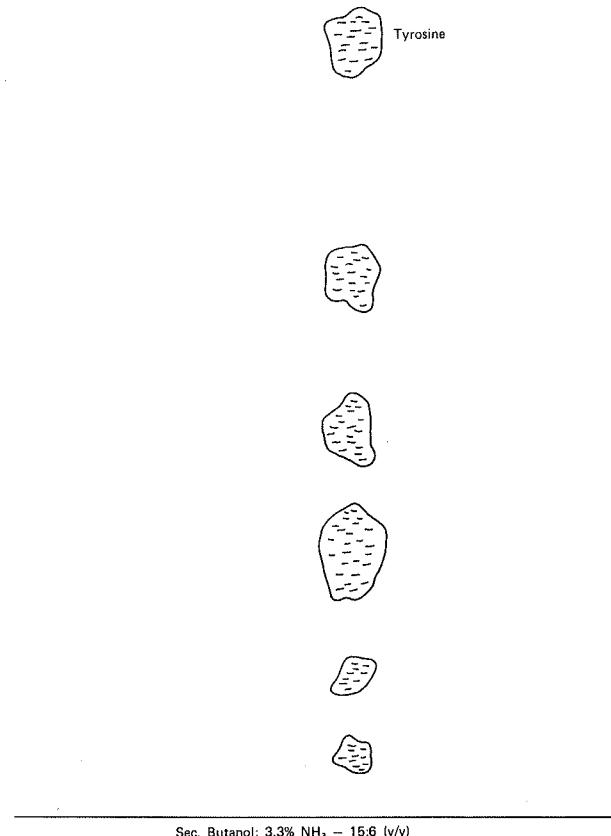
Figure 4 — Race T: Descending paper chromatogram, broken front, of tube 8 fraction, which was derived by column chromatography from concentrate extract n° 3

Figure 5 — Race O: Biological activity and protein dosage (Lowry & col.) associated with the concentrated extract developed in a G10 Sephadex column. The controls were taken for reference as 100

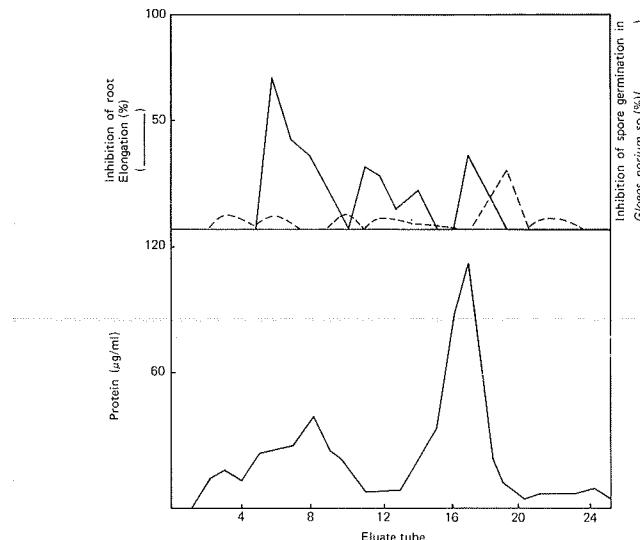
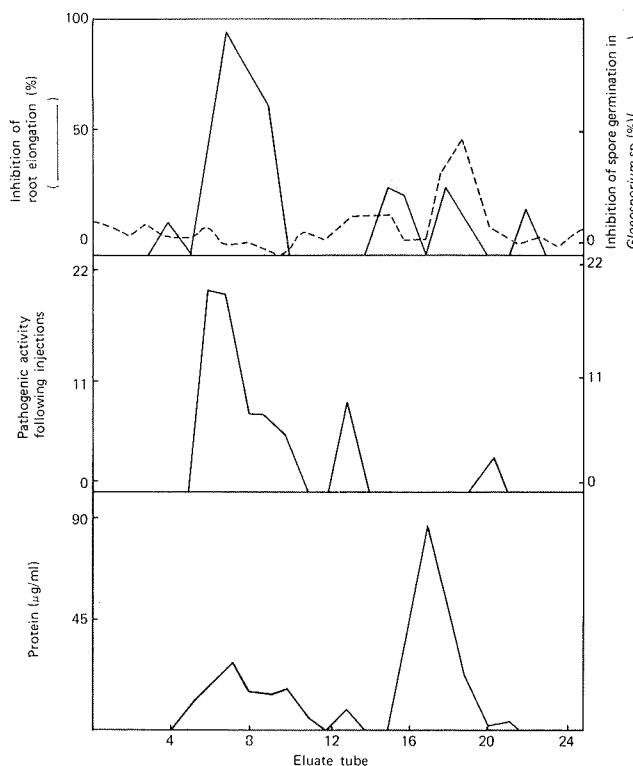


Figure 6 — Race T: Biological activity and protein dosage (Lowry & col.) associated with eluates derived from the concentrated extract developed in a G10 Sephadex column. The controls were taken for reference as 100



Discussion

Injections into maize stems were a suitable bioassay since only minute volumes were needed and the symptoms — yellowing, wilting,

and leaf necrosis — were quite clear in the test plants.

Culture filtrates from both isolates inhibited root elongation prior to and after concentration by lyophilization (Table 1), hence it was assumed that the latter process had not perceptibly affected the biological properties of the compounds involved.

After removing methanol and moving each aqueous extract through successive chloroform extractions (Figure 1), more water was added and the organic solvent was lyophilized out. Now, only the race T aqueous extract retained the ability to elicit the disease symptoms in maize. According to Comstock & Scheffer (3), salts, acids and staling products reach high enough concentrations in *H. maydis* culture media to cause leaf chlorosis in injected maize or to inhibit root elongation *in vitro*. This may account for the smaller pathological activity associated with race O filtrate and explain why no race O Sephadex eluate fraction induced symptoms in test plants (Table 3). Three distinct chromatographic analyses of the acidic hydrolysate (10) of the contents in tube 8 (race T) suggested at least 6 amino acid residues making up the peptide that clearly showed pathological activity. Evident as a yellow spot (ninhydrin) — and same Rf recorded in the standard — proline was found in two chromatograms and absent in the one, perhaps because in the latter it overlapped another amino acid. Unidentified spots were thought to indicate more than one amino acid residue. The anthrone test (11, 13) indicated, that tube n° 8 did not contain a glycopeptidic toxin.

Since the pathotoxin was detected in the eluate fractions 7, 8 and 9, it was assumed that its molecular weight exceeded 700 daltons. No additional Sephadex sizes were hand to further clarify this point.

Besides the peptidic compound pathogenic to maize and associated with lower eluate fractions (Figure 5 and 6), compounds(s) in tubes around tube 19, in both isolates, were the most active in inhibiting germination of *Gloeosporium* conidia. These latter eluate fractions showed higher peptide contents than the previous ones.

Could such or compounds somehow participate in the colonization process by *H. maydis*? For example, one might believe it worthwhile to investigate whether the peptide could have an antibiotic role in avoiding infection by locally invading, potentially pathogenic fungi.

References

1. Brune, W. — Levantamento sobre métodos de avaliação da lisina em proteínas. Anais da VII Reunião Brasileira do Milho, Viçosa, U.F.V., 1969.
2. Campos, V.P. & Carvalho, M.G. — Caracterização das raças de *H. maydis* e comportamento de linhagens de milho frente à raça T. Rev. Ceres, 21:329-343, 1974.
3. Comstock, J.C. & Scheffer, R.P. — Production and relative host-specificity of a toxin from *Helminthosporium maydis* race T. Plant Disease Reporter, 56:247-251, 1972.
4. Gracen, V.; Forster, M.J.; Sayre, K.D. & Grogan, C.O. — Rapid method for selecting resistant plants for control of Southern Corn Leaf Blight. Plant Disease Reporter, 55:469-470, 1971.
5. Gracen, V.E. & Grogan, C.O. — Reactions of Corn (*Zea mays* L.) seedlings with non-sterile, Texas male-sterile, and restored Texas male-sterile cytoplasms to *Helminthosporium maydis* toxin. Plant Disease Reporter, 56:432-433, 1972.
6. Heseltine, C.W.; Ellis, J.J. & Shotwell, O. — *Helminthosporium* secondary metabolites, Southern Leaf Blight of corn. J. Afr. Food Chem. 19:707-717, 1971. In: — Abstracts of Mycologia 5, Abstract 52-12:7151, 1971.
7. Hooker, A.L.; Smith, D.R.; Lim, S.M. & Beckett, J.B. — Reaction of corn seedlings with male-sterile cytoplasm to *Helminthosporium maydis*. Plant Disease Reporter, 54:708-712, 1970.
8. Hooker, A.L.; Smith, D.R.; Lima, S.M. & Musson, M.D. — Physiological races of *Helminthosporium maydis* and disease resistance. Plant Disease Reporter, 54:1109-1110, 1970.
9. Lim, S.M.: Hooker, A.L. & Smith, D.R. — Use of *Helminthosporium maydis* Race T pathotoxin to determine disease reaction of germinating corn seed. Agronomy Journal, 63:712-713, 1971.
10. Lowry, O.H.; Rosembrough, D.A.; Farr, A.L. & Randall, R.J. — Protein measurement with the phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193:265-293, 1951.
11. Mooris, D.L. — Quantitative determination of carbohydrate with Dreywood's anthrone reagent. Science, 107:254, 1948.
12. Newman, D.W. — Instrumental methods of experimental biology. Toronto, McMillan, 1964.
13. Owens, L.D. — Toxin in plant disease: structure and action. Science, 165:18-25, 1969.

