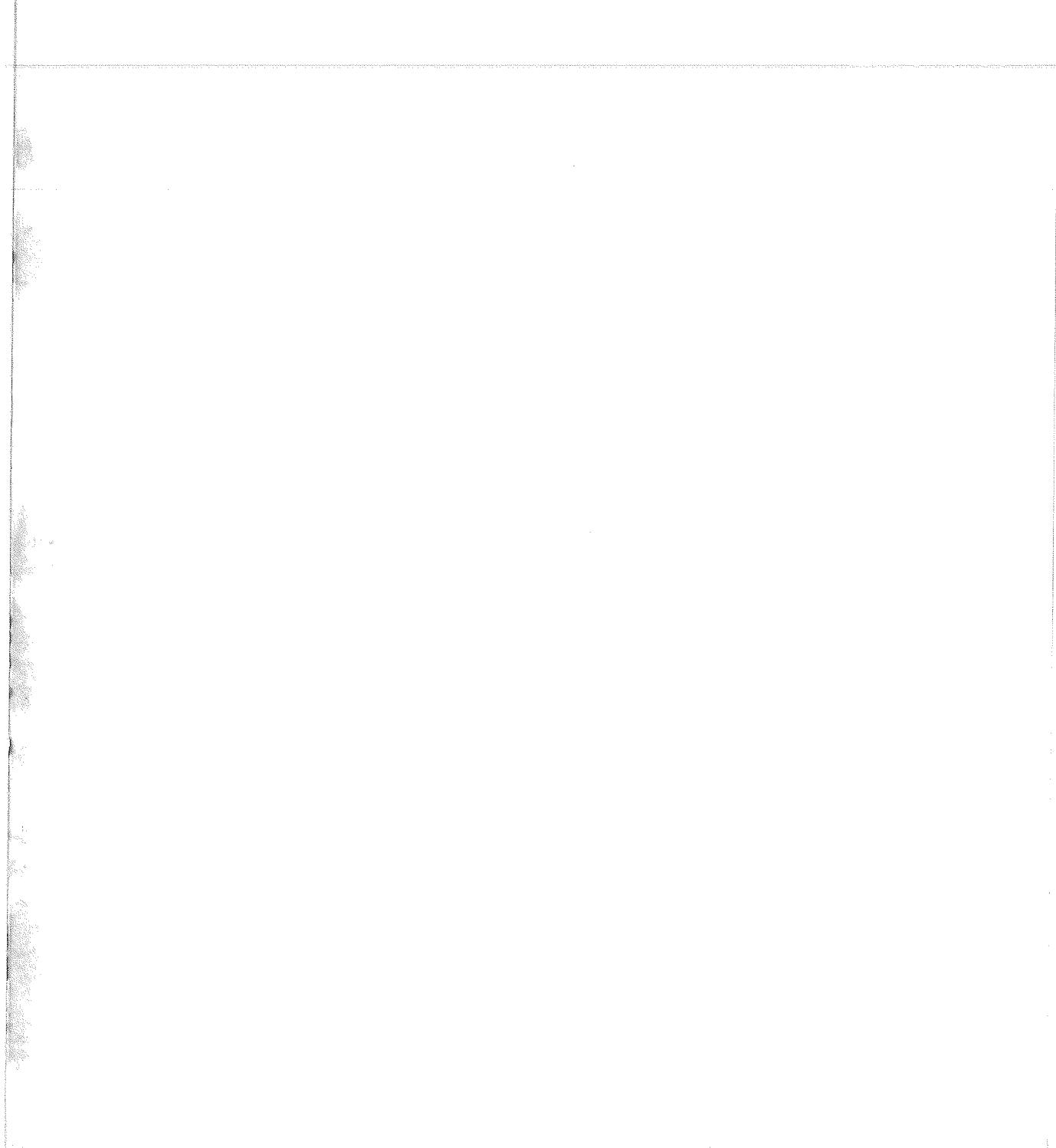


Volume 11 Número 4 Out.-Dez. 1980

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

GER NAO
SOMOS PARA MÃOS SEM
COR





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\$ 1.000,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 250,00 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

Vice-Presidente
João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

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

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 (A ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 11 Outubro-Dezembro 1980 Número 4

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11 (4)

CONTEÚDO

- Laurinda A. Soares
Octavio A.C. Pereira
& Osmane Hipólito 105 *Caracterização da primeira linhagem de vírus da laringotraqueite infecciosa (ILTV) no Brasil*
- Marcelo Magalhães
Adelma Véras
& Marlene Andrade 110 *Comparação entre "swabs" uretrais e sedimentos urinários no isolamento de agentes causais de uretrites*
- M. Adelaide S. da Cunha
Ítalo Suassuna
& Ivone Rocco Suassuna 113 *Níveis de sensibilidade "in vitro" de *Salmonella typhi* isolada no Brasil, no período de 1930 a 1973, a antimicrobianos de emprego clínico*
- João R.C. Andrade 117 *Papel da adesividade fimbrial na ceratoconjuntivite experimental por *Shigella flexneri**
- Saemi Ogassawara
Sérgio Benassi
Mitika K. Hagiwara
& Carlos Eduardo Larsson 126 *Isospora spp: estudo sobre a ocorrência na espécie felina, na cidade de São Paulo*
- Henrique S. Poltronieri
& Alcides Serzedello 131 *Produção de biomassa de *Rozites gongylophora* visando emprego como complemento alimentar*
- Maria Regina F. de Toledo
& Deise P. Falcão 136 **Yersinia enterocolitica* fermentadora rápida de lactose: isolamento a partir de material de garganta*

CONTENTS

- Characterization of the first strain of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in Brazil*
- Comparison of urethral swabs and urinary sediments for the isolation of causal agents of urethritis*
- In vitro sensitivity levels of *Salmonella typhi* isolated in Brazil, from 1930 to 1973, to antimicrobial drugs of clinical use*
- Role of fimbrial adhesiveness in experimental guinea-pig keratoconjunctivitis by *Shigella flexneri**
- Isospora spp: studies of its prevalence in domestic cat in the city of São Paulo*
- Production of biomass of *Rozites gongylophora* regarding its use as complementary feed*
- Yersinia enterocolitica* which ferments lactose rapidly: isolation from human's throat*

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.

Characterization of the first strain of infectious laryngotracheitis virus (ILT-V) in Brazil

Laurinda A. Soares
Octavio A.C. Pereira

*Department of Microbiology, Escola Paulista de Medicina,
Rua Botucatu, 862/3º andar,
04023 São Paulo SP, Brasil*

& Osmane Hipólito

*Department of Ornithopathology, University of São Paulo,
Cidade Universitária,
05508 São Paulo SP, Brasil*

Summary

From an acute outbreak of avian respiratory disease two virus strains were isolated, NDV and the strain 1543. Laboratory tests carried out identified 1543 as an atypical avirulent strain of infectious laryngotracheitis virus. Inoculation of the ILTV-1543 strain in embryonated hen's eggs produced death of the embryos and 0.5 - 1.0 mm pocks on the CAM. Electron microscopy revealed a herpesvirus, which induced intranuclear Feulgen-positive type A inclusion bodies in primary kidney cell cultures. The virus was HA-negative, was susceptible to 10% chloroform and to heat treatment. Stained with specific anti-ILTV conjugates, cells infected with the strain revealed typical immunofluorescence. The isolated strain was not neutralized by hyperimmune serum obtained from a classic virulent strain.

Resumo

Caracterização da primeira linhagem de vírus da laringotraqueite infecciosa (ILT-V) no Brasil

Duas amostras de vírus foram isoladas de um surto agudo de doença respiratória das aves, uma amostra de NDV e a amostra 1543. Provas laboratoriais identificaram a última como sendo uma amostra atípica, não virulenta, do vírus da laringotraqueite infecciosa das galinhas. A inoculação da amostra ILTV-1543 em ovos embrionados de galinha provocou a morte dos embriões e a forma de placas necróticas de 0.5 - 1.0 mm na CAM. A microscopia eletrônica revelou a presença de um herpesvírus, o qual induzia corpúsculos de inclusão do tipo A Feulgen-positivos em culturas primárias de células renais. O vírus era HA-negativo, suscetível a 10% de clorofórmio e ao tratamento pelo calor. Coradas com conjugados específicos anti-ILTV, células infectadas com a amostra revelaram imunofluorescência típica. A amostra isolada não foi neutralizada por soro hiperimune obtido de uma amostra clássica virulenta.

Introduction

The infectious laryngotracheitis virus of chickens, first described by May & Tittsler (15) in the United States, in 1923, has been noticed in many areas of the world. Its appearance was reported in Europe (12, 17), Australia (21), New Zealand (31), India (26) and South America (13, 18, 23).

Soon after the appearance of the first reports, Burnet (4) verified the existence of strains with immunological differences. He no-

ticed that some strains were not immediately inactivated by specific immune serum and that the addition of immune sera would cause a decrease in the mean diameter of CAM pocks. Epizootic strains were more readily neutralized by immune sera than enzootic strains, and were also more virulent.

This report describes for the first time in Brazil a strain of infectious laryngotracheitis virus, the ILTV-1543 strain, isolated from an atypical form of the disease, from a mixed infection with Newcastle disease virus (NDV).

Material and Methods

Virus strains — Two different virus strains were isolated from outbreaks of avian respiratory diseases, starting from winter 1973 (10, 28): one produced pocks on the CAM and the other one was HA-positive. The latter was identified as NDV and was further neutralized by anti-NDV hyperimmune serum, in order to isolate the pock-producing virus. This strain, called ILTV-1543, was suspected of being ILTV because the infected birds had strong haemorrhagic tracheas. The strain ILTV-1543, free from NDV, was inoculated on the CAM of developing chick embryos and produced small plaques on the membranes. Further studies were carried out with this strain to characterize it.

The virus strains Hitchner B₁ of NDV, Beaudette strain of infectious bronchitis virus (IBV), kindly supplied by Prof. Dr. Hipólito and Phelps strain of CELO virus (kindly supplied by Prof. Dr. Mayr, from Ludwig-Maximilians University, Munique, Alemania), were used throughout this study as control.

Virus propagation — For virus isolation, mace-rated pieces of lung and trachea of the dead birds were inoculated into the allantoic cavity and on the CAM of 8-11 days old chick embryonated eggs (20). The inoculated eggs were candled twice a day and the CAMs were examined for the presence of pocks, after embryos' death or in the 19th day of incubation.

For detection of cytopathic effect, primary kidney cell cultures from 18 days old chick embryos were used (5, 24, 26, 30). Culture medium was Hanks' balanced salt solution with 10% bovine serum and 0.5% lactalbumin hydrolisate. Monolayer cell cultures were obtained within 24-48 hours.

To follow cytopathic effect, Leighton tubes with primary cell cultures were inoculated with the 4th subculture of the virus strain, and at regular intervals coverslips were stained with May-Grunwald Giemsa stain.

Physico-chemical properties — The following tests were performed to characterize the physical-chemical properties of ILTV-1543 strain:

1. *Chloroform-resistance test was carried out according to Mayr & Bögel (16)* — Chorioallantoic membranes from eggs inoculated with

ILTV-1543 strain, which presented characteristic pocks, were grinded and then centrifuged at 3000rpm for 15 minutes. Supernatant fluid was divided into two portions: one of them was treated with 50% chloroform, agitated with a magnetic stirrer for one hour at 4C and then was allowed to stand overnight at 4C. After centrifugation at 3000rpm for one hour at 4C, the supernatant fluid was inoculated in cell cultures. CELO virus, which is chloroform-resistant, was used as control. Uninoculated cells, as well as untreated virus, were also employed as control. The same procedure was done with 10% chloroform. Coverslips were stained at regular intervals to follow the appearance of cytopathic effects.

2. *Heat-resistance* — Supernatant fluids from inoculated kidney cell cultures were centrifuged, divided into aliquots of 1ml and stored at -20C. Virus suspension had a TCID₅₀ of 10^{8.1}/ml. To verify heat-resistance, several tubes were placed in water-bath at 56C. After 5, 10, 15, 30 and 60 minutes tubes were tested to observe virus viability. All controls were carried out (22).

3. *Demonstration of nucleic acid* — Infected coverslips 24 and 48 hours post-inoculation were stained by Feulgen staining, slightly modified. Cells were washed twice in PBS, fixed for one hour in Carnoy's solution recently prepared, washed for 10 minutes in running tap water and hydrolized in 1 NHCl at 60C for 8 minutes.

4. *Electron microscopy studies* — Infected kidney cell cultures were first centrifuged at 3000rpm for 15 minutes, to eliminate cellular debris, and then centrifuged at 2000rpm for two hours. The precipitate was resuspended in 0.5ml distilled water, stained by PTA and immediately observed at electron microscopy. Infected CAMs with pocks were also examined. Pocks were carefully removed, triturated, stained by PTA and examined at electron microscopy (2).

5. *Haemagglutination tests* — Viral suspension from cell cultures and embryonated eggs were diluted in PBS in two-fold serial dilutions, starting from 1:5. Hen's red blood cells standardized at 0.75% in spectrophotometer were mixed with 0.05ml of diluted virus.

Immunological characteristics of ILTV-1543 strain were determined by immunofluorescence and neutralization tests — Immunofluorescence — Infected cell cultures on coverslips in Leighton tubes were fixed in acetone at -20°C for ten minutes. They were exposed to dry air for 30 minutes, immersed in Tween 80 at 3% in PBS and then stained with specific anti-ILTV conjugates, for 30 minutes at 37°C in humid chamber. Cells were then washed twice in PBS, ten minutes each washing, and mounted on slides with PBS plus 20% glycerine (11).

Two different conjugates anti-ILTV were employed: one obtained from a "classic" virulent strain and the other one from the avirulent strain 1416 Cover-Benton (6, 7). Specificity of the conjugates was tested against NDV, IBV, CELO virus, avian encephalomyelitis virus, influenza A virus and Marek's disease virus (supplied by Laboratories Salsbury, USA). Cells were stained at 8, 18, 24 and 48 hours p.i. It was difficult to fix them with acetone after 48 hours p.i.

Neutralization tests — Serum used in the neutralization tests was obtained by hyperimmunization of SPF chickens with a virulent virus strain isolated several years ago from an outbreak of the disease in the USA (supplied by Laboratories Salsbury). Serum was inactivated at 56°C for 30 minutes immediately before using and diluted with Hank's BSS in five-fold serial dilutions. A virus suspension containing 100 TCID₅₀ was mixed with equal volumes of the diluted serum and the mixture was held for one hour at 4°C (8).

Experimental inoculations — Immediately after isolation, ILTV-1543 strain was inoculated in day-old chicks and in young chickens in the trachea. The birds were inoculated with suspension of the CAM first egg passage and with virus suspension of the second passage in cell cultures. Ten months later, after storage at -20°C the same strain at the 5th passage in cell culture was inoculated again in young chickens.

Cutaneous inoculations were also performed in day-old chicks to differentiate the strain from pox virus (9).

Results

Inoculation of the strain 1543 in embryonated eggs produced death of some embryos and

pocks on the CAM of all eggs, starting from 5th day. Pocks were 0.5 - 1.0mm large, but some of them were confluent.

Cytopathic effect in cell cultures consisted of cell rounding, formation of multinucleated giant cells and cellular loosening from the tubes. Stained cultures showed more pronounced modifications. 16 hours p.i. many polycaryocytes were distributed through the infected cells and many cells had nuclei strongly stained. Nucleoli were not separated from the inclusions by any clear zone. 24 hours p.i. more polycaryocytes were seen, which had up to 20 nuclei. At this stage nucleoli were separated from inclusions by a clear zone. With progression of the infection more cells were infected and at 40 hours p.i. type A inclusions were seen retracted, very condensed and separated from nuclear membrane, the Cowdry's inclusions.

Physical-chemical tests revealed that ILTV-1543 strain was susceptible to 10% chloroform, heat susceptible at 56°C for five minutes, Feulgen-positive and HA-negative. Electron microscopy studies revealed particles with envelope similar to herpesvirus, measuring 90-100nm. Infected cells stained by anti-ILTV conjugates revealed typical fluorescence. 18 hours p.i. many cells had stronger fluorescence in the perinuclear membrane and granules of variable size in the nucleous. Some nuclei were totally fluorescent. At 24 hours p.i. many polycaryocytes were fluorescent, with the nuclear membrane more strongly stained.

Serum neutralization tests were negative.

Experimental inoculation tests were positive for day-old chicks inoculated with the strain at the beginning of the isolation experiments; birds showed respiratory distress and one of them died, the virus being reisolated. Inoculations performed ten months later with a frozen strain were negative, as well as negative was the cutaneous inoculation on day-old chicks.

Discussion

Laboratory tests, performed according to Mayr & col. (16, 17), diagnostic chart (17), confirmed the identification of the isolated strain. The ILTV-1543 strain was a mild strain of ILTV, which produced pocks of 0.5-1.0mm on the CAM and intranuclear type A inclusion bodies in primary kidney cell cultures; it was HA-negative, susceptible to chloroform and heat treatment, Feulgen-positive and had a structure

of a herpesvirus. The cutaneous inoculation of the strain on day-old chicks eliminated the possibility of being a pox virus. Also the clinical picture of the disease eliminated the possibility of Marek's disease (32). Staining of infected cells with anti-ILTV conjugates gave specific fluorescence.

Serum neutralization tests performed with anti-virulent strain serum gave negative results. This finding does not exclude the possibility of being ILTV, since many authors found similar strains. Studying different strains, Webster (31) observed two main types of pocks on the CAM: typical plaques of 3-5mm, from virulent strains and another minor type, 0.5mm diameter, isolated from mild forms of the disease. Anti-serum produced from the first type of strains would not neutralize virus from the second type. A mild strain, the C strain, producing small plaques, was not neutralized by its homologous antiserum. Similar observations were done by other authors (3, 6, 7, 19, 27). Different strains were isolated which showed different degrees of pathogenicity for chickens, some being virulent and some avirulent; in these cases the aviru-

lent strains were not neutralized by anti-serum produced from the virulent strains.

Pulsford (20) stated that a virus strain is endemic, of low virulence, when it first appears in a certain region. This low virulence is maintained through virus passage from hens to chicks, while the chicks still have maternal antibodies. One week-old chicks from endemic areas are resistant to the infection.

Regarding the low virulence, some investigators demonstrated that some strains provoke the enhancement of mild infections (1, 14, 25, 29). Sharma & Raggi (25) demonstrated that ILTV and NDV replicate independently when inoculated simultaneously in embryonated chicken eggs. In this respect, it is interesting to note that ILTV-1543 strain was isolated together with a NDV strain.

Acknowledgments

We thank Dr. A.A. Pinto and Luiza T. Iguti for their precious collaboration.

References

1. Bankowski, R.A. — Respiratory disease complex of chickens in the United States. *Brit. vet. J.*, 117:306-315, 1961.
2. Bayer, R.C.; Bryan, T.A.; Chawan, C.B. & Rittenburg, J.H. — Comparison of tracheal histopathology and scanning electron microscopy of infectious laryngotracheitis. *Poultry Sci.*, 56:964-968, 1977.
3. Benton, W.J.; Cover, M.S. & Greene, L.M. — The clinical and serological response of chickens to certain laryngotracheitis viruses. *Avian Dis.*, 2:383-396, 1958.
4. Burnet, F.M. — Immunological studies with the virus of ILT of fowls using the developing egg technique. *J. exptl. Med.*, 63:685-701, 1936.
5. Buthala, D.A. & Mathews, J. — Use of cellular cultures of chicken embryo tissue in virus studies. *Cornell Vet.*, 47:143-159, 1957.
6. Cover, M.S. & Benton, W.J. — The isolation of viral agent from chickens showing respiratory distress. *Avian Dis.*, 1:54-61, 1957.
7. Cover, M.S. & Benton, W.J. — The biological variation of infectious laryngotracheitis virus. *Avian Dis.*, 2:375-383, 1958.
8. Cunningham, C.H. — Immunologic methods in avian research. *Avian Dis.*, 17:227-235, 1973.
9. Herzberg, K. — Vergleichende Vaccinevirusuntersuchungen. *Zbl. Bakt. I Orig.*, 162:408-430, 1955.
10. Hipólito, O.; Soares, L.A.; Pereira, O.A.C.; Pinto, A.A. & Bottino, J.A. — Isolamento e identificação do vírus da laringotraqueite infecciosa das galinhas no Brasil. V Congres. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, 1974.
11. Hitchner, S.B.; Fabricant, J. & Bagust, T.J. — A fluorescent antibody study of the pathogenesis of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, 21:185-194, 1977.
12. Jordan, F.T.W. — A review on the literature on infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, 10:1-26, 1966.
13. Keller, K. & Hebel, P. — Diagnóstico de las inclusiones de laringotraqueitis infecciosa en frotis y cortes histológicos. *Zoosanitaria (Chile)*, 4:1-6, 1962.
14. Mackowiak, P.A. — Microbial synergism in human infections (II). *New England J. Med.*, 298:21-26, 1978.
15. May, H.G. & Tittsler, R.P. — Tracheo-laryngitis in poultry. *J. Am. vet. Med. Ass.*, 67:229-231, 1925.
16. Mayr, A. & Bögel, K. — Der Chloroform-Resistenztest zur Isolierung und Charakterisierung von Enteroviren. *Zbl. Bakt. I. Orig.*, 182:564-570, 1961.
17. Mayr, A., Dorn, P. & Mahnel, H. — Über eine atypische, milde Verlaufsform der infektiösen Laryngotracheitis des Geglügels mit besonderer Berücksichtigung der Diagnose und Differential-diagnose. *Zbl. Vet. Med.*, B, 7:572-583, 1964.
18. Monteverde, J.J., Simeone, D.H., Moran, B.L., Chialvo, E.J. & Garbini, J. — Outbreak of avian infectious laryngotracheitis. *Rev. Fac. Agron. (B. Aires)*, 15:12-29, 1962.
19. Pulsford, M.F. — Infectious laryngotracheitis of poultry. I — Virus variation, immunology and vaccination. *Vet. Bull.*, 33:415-420, 1963.
20. Pulsford, M.F. — Infectious laryngotracheitis of poultry. II — Virus culture, epidemiology and miscellaneous. *Vet. Bull.*, 33:477-483, 1963.

21. Pulsford, M.F. & Stokes, J. — Infectious laryngotracheitis in South Australia. *Austr. Vet. J.*, 29:8-12, 1953.
22. Quiroz, C.A. & Hanson, R.P. — Physical-chemical treatment of inocula as a mean of separating and identifying avian viruses. *Avian Dis.*, 2:94-98, 1962.
23. Ramos, B.J. & Bambini, B.C. — Investigacion preliminar de suero neutralizacion para la detección de anticuerpos neutralizantes contra los virus de bronquitis infecciosa y laringotraqueitis infecciosa en el Peru. *Rev. Inst. Zool. Invest. Pec.*, 1:111-115, 1971.
24. Reynolds, H.A.; Watrach, A.M. & Hanson, L.E. — Development of the nuclear inclusion bodies of infectious laryngotracheitis. *Avian Dis.*, 12:332-347, 1968.
25. Sharma, J.M. & Raggi, L.G. — Dual infection with Newcastle disease and infectious laryngotracheitis viruses. *Am. J. Vet. Res.*, 26:965-978, 1965.
26. Sharma, S.; Bhambhani, B.D. & Agarwal, K.K. — A note on the isolation and characterization of infectious laryngotracheitis virus of poultry. *Indian J. Animal Sci.*, 209-210, 1974.
27. Shibley, G.P.; Luginbuhl, R.E. & Helmboldt, C.F. — A study of infectious laryngotracheitis virus strains. I — Comparison of serological and immunogenic properties. *Avian Dis.*, 6:59-71, 1962.
28. Soares, L.A. — Caracterização da amostra LT-1543 do vírus da laringotraqueite infecciosa das galinhas. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1977. (Tese de Doutoramento).
29. Tripathy, D.N.; Sells, D.M. & Hanson, L.E. — Natural pox and herpes as a dual viral infection in chickens. *Avian Dis.*, 19:75-81, 1975.
30. Watrach, A.M. & Hanson, L.E. — Cytopathic effect of infectious laryngotracheitis virus in cultures of chicken embryo kidney cells. *Proc. Soc. exptl. Biol. (N.Y.)*, 112:230-232, 1963.
31. Webster, R.G. — Studies on infectious laryngotracheitis in New Zealand. *N.Z. vet. J.*, 7:67-71, 1959.
32. Witter, R.L.; Burgoyne, G.H. & Solomon, J.J. — Evidence of a Herpesvirus as an etiologic agent of Marek's disease. *Avian Dis.*, 13:171-184, 1969.

Comparação entre "swabs" uretrais e sedimentos urinários no isolamento de agentes causais de uretrites

Marcelo Magalhães

Adelma Véras

& Marlene Andrade

Laboratório de Patologia Clínica do Recife,

Rua 7 de Setembro, 508

50000 Recife PE, Brasil

Resumo

Sedimentos obtidos pela centrifugação de 10-20ml dos primeiros jatos urinários foram incapazes de evidenciar 15 (71%) amostras de *Chlamydia* e 7 (18%) amostras de *Ureaplasma* que foram detectadas pelo cultivo de "swabs" uretrais. Ambos espécimes forneceram idêntico número de culturas positivas de *Neisseria gonorrhoeae* (27) e de *Trichomonas* (4). Os resultados mostram que os primeiros jatos urinários não são espécime adequado ao diagnóstico etiológico das uretrites não gonocócicas.

Summary

Comparison of urethral swabs and urinary sediments for the isolation of causal agents of urethritis

Sediments obtained by centrifuging the first 10-20ml of freshly voided urine missed 15 (71%) of *Chlamydia* and 7 (18%) of *Ureaplasma* isolates which were detected by culturing urethral swabs. Both specimens yielded the same number of positive cultures of *Neisseria gonorrhoeae* (27) and *Trichomonas* (4). The results show that the first voided urine is not a suitable specimen for the etiological diagnosis of nongonococcal urethritis.

Introdução

No diagnóstico microbiológico das uretrites é comum utilizar-se, indiferentemente, como espécimes para cultivo, secreções uretrais (colhidas através de "swabs" ou alças de platina) ou centrifugados de primeiros jatos urinários. Desde que os sedimentos urinários têm a vantagem da comodidade e de não causarem apreensão e desconforto aos pacientes, procurou-se avaliar o seu desempenho, com o fornecido pelas secreções uretrais, na evidenciação de conhecidos agentes causais de uretrites, tais como: *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Trichomonas vaginalis*.

Material e Métodos

Pacientes — Homens, portadores de corrimento uretral, evidente ao exame físico, foram sele-

cionados para o estudo, independentemente do tempo de doença ou do uso prévio de drogas antimicrobianas. Os pacientes provieram de diversas clínicas urológicas privadas e foram instruídos para comparecerem ao laboratório antes da primeira micção matinal.

Coleta dos espécimes — O "swab" de algodão era introduzido 2-4cm na uretra e em seguida agitado em tubo de ensaio, contendo 0,2ml de caldo de coração e cérebro. O "swab" era reintroduzido, friccionado levemente nas paredes da uretra e agitado em outro tubo, contendo 2ml de meio de crescimento para *Chlamydia* (meio basal de Eagle, adicionado de soro fetal, glutamina e vitaminas). Após a coleta da secreção uretral, 10-20ml dos primeiros jatos urinários eram centrifugados a 3000rpm durante 10 minutos para a obtenção do sedimento. As secreções uretrais e os sedimentos urinários eram imediatamente inoculados, nos diversos meios de isolamento.

Métodos microbiológicos — No isolamento de *N. gonorrhoeae*, empregou-se o meio Cidade de Nova York modificado (10); após 18h de incubação a 36°C, em atmosfera 5-10% de CO₂, as colônias suspeitas eram identificadas por imunofluorescência direta (3). No isolamento e identificação de *U. urealyticum* (Mycoplasma linhagem T), utilizou-se o meio diferencial A7 (8), incubação em anaerobiose durante 48h e observação direta das colônias, sob pequeno aumento do microscópio (100X). Na detecção de *T. vaginalis*, empregou-se o método da cultura em meio líquido cisteína-peptona-fígado-maltose (2), incubação durante 4 dias e pesquisa do protozoário em gota pendente. Na investigação de *C. trachomatis*, seguiu-se às recomendações de Reeve & col. (7); em resumo: os espécimes foram inoculados, por centrifugação, em monocamadas de células McCoy, cultivadas sobre lamínulas e previamente tratadas pela desoxiruridina. Após 48h a 37°C, as lamínulas eram fixadas em metanol, coradas pela iodina e examinadas sob o aumento de 400X.

Resultados e Discussão

Os resultados comparativos, entre o desempenho das secreções uretrais e dos sedimentos urinários, na detecção de agentes etiológicos de uretrites, estão sintetizados na Tabela 1. Embora as taxas de isolamento de *N. gonorrhoeae* e *T. vaginalis* não tenham sido afetadas pelo tipo de espécime cultivado, os sedimentos urinários proporcionaram acentuada redução no número de culturas positivas de *Chlamydia* (71%), e em menor extensão no de *Ureaplasma* (18%). Além disso, quando as culturas positivas fornecidas por ambos espécimes foram comparadas do ponto de vista quantitativo, observou-se que as culturas das secreções uretrais mostraram maior número de corpos de inclusão de clamídia, por lamínula, ou de colônias

de micoplasma nas placas do meio A7 (8), demonstrando-se, mais uma vez, a evidente superioridade das secreções uretrais, como fonte daqueles microrganismos. Esses dados coincidem com os obtidos por Smith & Weed (9), no que concerne ao isolamento de clamídias, porém são diferentes dos encontrados por Kundsinn & col. (5), que observaram superioridade dos sedimentos urinários, no isolamento de ureaplasmas. Entretanto, como esses autores empregaram, também, meios líquidos, isso poderia explicar a divergência de resultados.

A explicação, para o maior índice de positividade das secreções uretrais, é, até certo ponto, difícil. Embora fosse racional supor que o jato urinário pudesse arrastar microrganismos situados nas porções mais distais da uretra, passíveis de não serem tocadas pelo "swab", tais organismos devem estar firmemente aderidos à mucosa. Além do mais, a eventual presença de substâncias tóxicas na urina, ou mesmo questões ligadas à tonicidade urinária poderiam ter influído na viabilidade das clamídias e ureaplasmas. Evidentemente, se a urina é colhida no domicílio do paciente, em vez de no laboratório, o desempenho dos sedimentos urinários, no isolamento de clamídias e ureaplasmas, decrescerá ainda mais.

Apesar do razoável número (120) de casos examinados, os critérios utilizados na seleção dos pacientes não permitem tirar conclusões a respeito da freqüência relativa dos microrganismos encontrados. Isto porque, muitos dos pacientes que forneceram material para o estudo haviam feito uso recente de drogas antimicrobianas, algumas delas capazes de prejudicar selectivamente o isolamento de determinados agentes. Assim, por exemplo, é comum no Recife o uso indiscriminado da rifampicina, no tratamento de uretrites, droga essa capaz de inibir o crescimento de *N. gonorrhoeae* e *C. trachomatis*, sem afetar *U. urealyticum* e *T. vaginalis*.

Tabela 1 — Resultados comparativos entre o cultivo das secreções uretrais e sedimentos urinários em 120 casos de uretrites

Resultados	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>Chlamydia</i> sp.	<i>Ureaplasma</i> sp.	<i>Trichomonas</i> sp.
Uretral positiva	27 (100)	6 (29)	32 (80)	4 (100)
Urina positiva				
Uretral positiva	0	15 (71)	7 (18)	0
Urina negativa				
Uretral negativa	0	0	1 (2)	0
Urina positiva				

Nota: Os números entre parênteses referem-se aos percentuais.

Com referência à etiologia das uretrites, investigação em progresso neste laboratório vem confirmado inquéritos semelhantes, realizados em

outras regiões (1, 4, 6), responsabilizando *C. trachomatis* pela maioria das uretrites não gonocócicas masculinas.

Referências Bibliográficas

1. Alani, M.D.; Darougar, S.; Burns, D.C.M.; Thin, R.N. & Dunn, H. — Isolation of *Chlamydia trachomatis* from the male urethra. Br.J. Ven. Dis., 53:88-92, 1977.
2. Carneri, I.; Emanueli, A. & Signoreli, I. — Efficiency of microscopic examination of fresh smears and cultures in diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. Amer.J. Obstet. Gynec., 100:299-301, 1968.
3. Danielsson, D. — The demonstration of *N.gonorrhoeae* with the aid of fluorescent antibodies. 6 — A comparison of conventional methods and fluorescent antibody (FA) techniques with counterstaining for the demonstration of *N.gonorrhoeae*. Acta. derm. venereol. (Stockh.), 45:74-80, 1965.
4. Holmes, K.K.; Handsfield, H.H.; Wang, S.P.; Wentworth, B.B.; Turck, M.; Anderson, J.B. & Alexander, E.R. — Etiology of nongonococcal urethritis. N.Eng.J.Med., 292:1199-1205, 1975.
5. Kundsin, R.B.; Paneno, A. & Poulin, S. — Significance of appropriate techniques and media for isolation and identification of *Ureaplasma urealyticum* from clinical specimens. J.Clin.Microbiol., 8:445-453, 1978.
6. Perroud, H.M. & Miedzybrodzka, K. — Chlamydial infection of the urethra in men. Br.J.Vener.Dis., 54:45-49, 1978.
7. Reeve, P.; Owen, J. & Oriel, J.D. — Laboratory procedures for the isolation of *Chlamydia trachomatis* from the human genital tract. J.clin.Path., 28:910-914, 1975.
8. Shepard, M.C. & Lunceford, C.D. — Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasma) in primary cultures of clinical material. J.Clin.Microbiol., 3:613-625, 1976.
9. Smith, T.F. & Weed, L.A. — Comparison of urethral swabs, urine, and urinary sediment for the isolation of *Chlamydia*. J.Clin.Microbiol., 2:134-135, 1975.
10. Young, H. — Cultural diagnosis of gonorrhoeae with modified New York City (MNYC) medium. Br.J.Vener. Dis., 54:36-40, 1978.

**Níveis de sensibilidade
"in vitro" de *Salmonella typhi*
isolada no Brasil,
no período de 1930 a 1973,
a antimicrobianos de emprego clínico***

Maria Adelaide Silva da Cunha
Ítalo Suassuna

*Faculdade de Ciências Médicas UERJ,
Departamento de Microbiologia e Imunologia,
Rua Teodoro da Silva, 48
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

& Ivone Rocco Suassuna

*Instituto de Microbiologia da UFRJ,
Centro de Ciências da Saúde,
Bloco I, Ilha do Fundão
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

Resumo

Foi determinada a C.I.M. de 85 amostras de *Salmonella typhi* aos antimicrobianos de maior uso clínico no tratamento de casos de febre tifóide ou de portadores, incluindo-se a tetraciclina para comparação. Exceto três culturas tipo, estas amostras foram isoladas no Brasil de hemoculturas e coproculturas, em diferentes Estados, no período de 1930-1973. Pela divisão das amostras estudadas, de acordo com as datas de isolamento, em quatro grupos (1930-1940; 1950-1960; 1961-1965; 1966-1973) verificou-se uma leve tendência de aumento da C.I.M. para a ampicilina, nos anos mais recentes, não sendo evidente este aumento para os outros agentes, em qualquer período.

Summary

In vitro sensitivity levels of Salmonella typhi isolated in Brazil, from 1930 to 1973, to antimicrobial drugs of clinical use

Eighty five strains of *Salmonella typhi* were tested by agar dilution method to ascertain their sensitivity to the most used antimicrobials of clinical use for treatment of cases or carriers in typhoid fever. Tetracycline was included for comparison. Except for three type cultures, these strains were isolated in Brazil, originating from blood and stool cultures in different states, in the period from 1930 to 1973. By dividing the studied strains according to the date of isolation in four groups (1930-1940; 1950-1960; 1961-1965; 1966-1973) a slight tendency to an increase in the M.I.C. was shown to ampicillin in most recent years, with no evident increase to the other agents otherwise.

Introdução

O uso indiscriminado de antibióticos tem trazido vários problemas, sobretudo o aumento da resistência de determinados microrganismos, sendo a literatura farta em exemplos e dados que motivam sérias preocupações quanto ao futuro da terapêutica de muitas doenças infeciosas. Esse aspecto causa maior preocupação

em infecções para cujo tratamento só se dispõe de número reduzido de antibióticos, como vem sendo o caso da febre tifóide, para a qual, durante duas décadas, o cloranfenicol foi aceito como droga de escolha no tratamento da infecção.

A partir de 1960, o aparecimento de amostras resistentes a este antibiótico, particularmente na Índia (1,12) e mais recentemente o apareci-

* Parte do trabalho de Tese de Mestrado apresentado no Instituto de Microbiologia UFRJ, com apoio financeiro da CAPES e ABIF.

mento de amostras multirresistentes no México (3), tem sido motivo de preocupação da Comissão de Peritos em Antibióticos da Organização Mundial de Saúde, levando esta a enfatizar a necessidade de estudos em todos os países, sobre a verificação do aumento progressivo da resistência às drogas de uso terapêutico mais comum. Amostras resistentes à ampicilina foram também observadas por vários autores (9, 10, 11, 12, 13), aumentando a preocupação, por ser a ampicilina o antibiótico de segunda opção no tratamento da febre tifóide (2, 8, 14).

O aparecimento de amostras de *Salmonella typhi* devido a presença de fator R, nos levou a verificar a variação das concentrações inibitórias mínimas (C.I.M.) dos antimicrobianos utilizados, em função das datas de sua introdução e do isolamento das amostras estudadas, assim como, buscar evidências da seleção de mutantes relativamente mais resistentes, ou da resistência a níveis muito elevados associados com fatores R.

Material e Métodos

Foram empregadas, no presente trabalho, 85 amostras de *S. typhi* isoladas, em sua maioria, a partir de hemoculturas e coproculturas de casos de febre tifóide, em um período que se estende de 1930 a 1973, exceto entre 1941-1949. A maioria dos isolamentos havia sido conservada no Laboratório de Enterobactérias do Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Identificação bioquímica — Confirmada inicialmente a pureza das amostras por semeadura e isolamento em meio indicador (E.M.B. Agar

Difco) (5), foram feitos repiques para meios de triagem, sendo utilizados os meios S.I.M. (5) e o meio Duplo Açúcar-Uréia (16,17).

Identificação sorológica — Caracterizada bioquimicamente de modo sumário, a identidade das amostras foi confirmada por reatividade sorológica específica em lâmina com soros polivalentes anti-*Salmonella*, anti-flagelar d, e anti-somático (9, 12). O preparo dos soros obedeceu às instruções de Edwards & Ewing (6).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Para avaliação da sensibilidade das amostras, utilizamos o método de diluição seriada em meio sólido. Foram testadas primeiramente dez concentrações de 0,0125 a 12,8 µg/ml dos seguintes antimicrobianos: ampicilina (A), cloranfenicol (Cl), tetraciclina (T) e associação sulfametoazol-trimetoprim (SMZ/TM). Adotando-se as recomendações feitas por Grove & Randall (7), no que se refere ao inóculo, utilizamos volumes correspondentes a uma alça de 4mm de diâmetro da diluição 1×10^{-3} de cada uma das culturas de 24 horas em meio de Mueller-Hinton "Difco" (5).

Resultados

Pelas datas de isolamento das amostras estudadas, podemos verificar a variação das C.I.M. dos antimicrobianos tendo em conta as datas de suas introduções.

As Tabelas 1, 2, 3 e 4, mostram os resultados encontrados em relação a esses dados. As amostras foram distribuídas de acordo com a data de isolamento. Expressando o número de amostras sensíveis a cada concentração, pelo percentual acumulado correspondente ao nú-

Tabela 1 — Níveis de sensibilidade de 85 amostras de *Salmonella typhi* ao cloranfenicol de acordo com o períodos em que foram isoladas

Ano	Número total de amostras	Concentrações mínimas inibitórias (µg/ml)					
		0,4		0,8		1,6	
		S	%	S	%	S	%
1930-1940	13	0	0	0	0	4	30,76
1950-1960	8	0	0	1	12,5	4	50,00
1961-1965	29	1	3,44	2	6,89	9	31,03
1966-1973	35	0	0	1	2,85	2	5,71
						23	65,71
							35 100

S = Número de amostras sensíveis

% = Percentual acumulado

Tabela 2 — Níveis de sensibilidade de 85 amostras de *Salmonella typhi* à ampicilina de acordo com o período em que foram isoladas

Ano	Número total de amostras	Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		0,4		0,8	
		S	%	S	%
1930-1940	13	10	76,92	13	100
1950-1960	8	4	50,00	7	87,50
1961-1965	29	18	62,06	28	96,55
1966-1973	35	8	25,00	32	91,42

S = Número de amostras sensíveis

% = Percentual acumulado

Tabela 3 — Níveis de sensibilidade de 85 amostras de *Salmonella typhi* à tetraciclina de acordo com o período em que foram isoladas

Ano	Número total de amostras	Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
		0,2		0,4	
		S	%	S	%
1930-1940	13	0	0	0	0
1950-1960	8	0	0	1	12,5
1961-1965	29	0	0	1	3,44
1966-1973	35	1	2,85	1	2,85

S = Número de amostras sensíveis

% = Percentual acumulado

Tabela 4 — Sensibilidade de 85 amostras de *Salmonella typhi* à associação sulfametoazol-trimetoprim de acordo com o período em que foram isoladas

Ano	Número total de amostras	Concentrações mínimas inibitórias ($\mu\text{g}/\text{ml}$)					
		0,1		0,2		0,4	
		S	%	S	%	S	%
1930-1940	13	0	0	0	0	4	30,76
1950-1960	8	2	25	2	25	7	87,50
1961-1965	29	0	0	1	3,44	8	27,58
1966-1973	35	0	0	0	0	6	17,14

S = Número de amostras sensíveis

% = Percentual acumulado

mero total de amostras isoladas naquele período, não observamos aumento relativamente significativo das C.I.M. das amostras isoladas nos primeiros anos, em relação aos anos mais recentes. Isso se verificou para todos os antimicrobianos testados. Um aumento mais acentuado apenas se observa na Tabela 2 em relação à ampicilina, para a qual 100% das estirpes de *S.typhi*, isoladas no período de 1930-1940, foram sensíveis à concentração de 0,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e, no período de 1966-1973, 100% das amostras o

foram a 3,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, concentração esta quatro vezes maior que a primeira. Isso pode refletir uma leve tendência a um aumento da resistência das estirpes isoladas nos últimos anos.

Discussão

Embora nossos resultados nos tranquilizem quanto à estabilidade observada nas amostras testadas, Costa & Hofer (4) verificaram em rela-

ção ao cloranfenicol, um aumento na resistência de 1,74 para 8,6 μ g/ml de amostras isoladas no Rio de Janeiro, comparando dois períodos diferentes. Observa-se, ainda, que os agentes, de emprego clínico habitual no tratamento da febre tifóide, comportaram-se como a tetraciclina, não especificamente usada nessa condição.

Concluindo, não foi evidente a resistência de *S. typhi* "in vitro" em níveis considerados clinicamente significativos. *S. typhi* parece ser mui-

to estável aos antimicrobianos, em comparação com outras salmonelas e enterobactérias, não tendo havido alterações de seus níveis de sensibilidade em 85 amostras isoladas ao longo de 43 anos. No entanto, é necessário estar prevenido para o possível aparecimento de casos isolados, que não respondam ao tratamento, sendo de extrema importância, também, a observação do aumento da resistência a cada ano, a exemplo de outros países (3, 13, 16).

Referências Bibliográficas

- Agarwal, S.C. — Chloramphenicol resistance of salmonella species in India, 1959-1961. Bull. W.H.O., 27:331-335, 1962.
- Butler, T.; Linh, N.H.; Arnold, K. & Pollack, M. — Chloramphenicol: resistant typhoid fever in Vietnam associated with R factor. Lancet, 2:983-985, 1973.
- Cortés, A.G.; Bessudo, D.M.; Sanchez-Leyba, R.; Fragozo, R.; Hinojosa, M. & Becerril, P. — Transmission of *Salmonella typhi* resistant to chloramphenicol through the water: community outbreak in México. Bol. of Sanit. Panam., 75:375-381, 1974.
- Costa, E.A. & Hofer, E. — Resistência ao cloranfenicol de amostras de *Salmonella typhi* isoladas em alguns Estados do Brasil. Hospital, 79:5-18, 1971.
- Difco Manual. 9th ed. Michigan, Difco Laboratories Incorporated, 1972.
- Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of *Enterobacteriaceae*. 2nd ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, 1962.
- Grove, D.C. & Randall, W.A. — Assay methods of antibiotics: a laboratory manual. New York, Medical Encyclopedia, 1955.
- Gutiérrez, G.; Serafin, F.; Sanchez, R.; Munoz, O. & Kumate, J. — Evaluación de cuatro antimicrobianos en el tratamiento de tifoidea por *Salmonella typhi* resistente a cloranfenicol. Bol. Med. Hosp. Infant., 31:597-606, 1974.
- Krech, V. & Modde, H. — Experimental testings of salmonella resistance to ampicillin with reference to the problem of carriers. Chemotherapia Suisse, 12:26-35, 1967.
- Lampe, R.M.; Duangmani, C. & Mansuwan, P. — Chloramphenicol and ampicillin-resistant typhoid fever. J. Amer. Med. Ass., 233:768, 1975.
- Le Noc, P. — Sensibilité à l'ampicilline de 578 souches bactériennes isolées en Afrique. Bull. Soc. Pathol. Ex., 62:468-476, 1969.
- Manten, A.; Guinée, P.A.M.; Kampelmacher, E.H. & Voogd, C.E. — An eleven year study of drug resistance in *Salmonella* in the Netherlands. Bull. W.H.O., 45:85-93, 1971.
- Olarte, J. & Galindo, E. — *Salmonella typhi* to chloramphenicol, ampicillin and other antimicrobial agents: strains isolated during an extensive typhoid fever epidemic in México. Antimicrob. Agents Chemother., 4:597-601, 1973.
- Robertson, R.A.; Wahab, M.F.A. & Baasch, F.O. — Evaluation of chloramphenicol and ampicillin in *Salmonella* enteric fever. New Engl. J. Med., 278:171-176, 1968.
- Rodríguez, M.; Rebollo, M.C.; Pichuantes, S.; Fernández, M.E. & Palomino, C. — Fator de resistência transferível a antibióticos en enterobacteriaceae com especial referencia a *Salmonella typhi*. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 19:127-139, 1977.
- Suassuna, I. & Suassuna, I.R. — Enterobactérias: diferenciação bioquímica. Rev. Bras. Patol. Clin., 5:8-18, 1969.
- Suassuna, I. & Suassuna, I.R. — Duplo açúcar-uréia-agar (DAU): um meio de triagem para enterobactérias (Nota técnica). Rev. Bras. Patol. Clin., 14:201-202, 1978.
- Virgilio, R. & Cordano, A.M. — Susceptibilidad de *Salmonella typhi* a cloranfenicol y otros antibióticos: primeiras cepas chilenas multirresistentes. Rev. lat. Amer. Microbiol., 19:67-72, 1977.

**Role of fimbrial adhesiveness
in experimental guinea-pig
keratoconjunctivitis by
*Shigella flexneri****

João R.C. Andrade

Department of Microbiology and Immunology
of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Av. 28 de Setembro, 87
20000 Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Summary

The present investigation evaluates the significance of type 1 fimbriae of *S. flexneri* 3 (strain 1225/53) in the production of experimental keratoconjunctivitis in guinea-pigs. We obtained evidence that type 1 fimbriae play a significant role in the virulence of strain 1225/53 by determining the Infectious Dose 50% for the microorganism's fimbriate and non-fimbriate phase. Additional evidence was obtained after specific blocking of the fimbrial adhesiveness by D-mannose or by treatment with univalent fragments of specific antibodies. The latter were obtained by enzymatic digestion (papain) of the immunoglobulins directed towards the surface antigens of the fimbriated phase of *S. flexneri* 1225/53.

Resumo

Papel da adesividade fimbrial na ceratoconjuntivite experimental por Shigella flexneri

Avaliamos a importância das fímbrias do tipo 1 de *Shigella flexneri* 3 (amostra 1225/53), para obtenção de ceratoconjuntivite em cobaio. Obtivemos evidências de que as fímbrias desempenham papel significativo na virulência da amostra 1225/53, através da determinação da Dose Infectante 50% para as fases fimbriada e não-fimbriada do microrganismo. Evidências adicionais foram obtidas, após bloqueio específico da adesividade fimbrial por D-manoose ou tratamento por fragmentos monovalentes de anticorpos específicos, resultantes da digestão enzimática (papaina) de imunoglobulinas orientadas para os抗énios de superfície da fase fimbriada do microrganismo.

Introduction

Infections by *Shigella* have been the aim of considerable experimental investigation, which resulted in the elucidation of many aspects of their pathogenesis, particularly the multifactorial nature of bacterial virulence. However, the mechanisms of colonization of mucous membranes by *Shigella* and the organism structures involved in this process have not yet been conveniently elucidated.

Recently, the role of the bacterial adhesiveness in the implantation of normal (11, 29) and pathogenics (1, 10, 11, 15) microorganisms to the several mucosal surfaces of the human or-

ganism has been recognized. Such adhesive characteristics which are mediated by a multiplicity of bacterial structures present as a common characteristic to be localized on the external surfaces of the bacterial cells.

Shigella flexneri and certain serologic types of *Shigella boydii* have proteic and filiform structures called type 1 fimbriae provided with adhesive action to epithelial cells, erythrocytes and inert particles (6, 14) that can be blockaded or reversed by D-mannose (14, 22). Such fimbriae possessing mannose-sensible adhesiveness are widely distributed among *Enterobacteriaceae* and seem to link themselves to cellular receptors constituted by mannose residues loca-

* This investigation was supported in part by CAPES and Fundação ABIF.

ted in the cytoplasmatic membrane of guinea-pig erythrocytes or human epithelial cells (18, 25, 26, 27).

Beside antigenically different from other surface antigens (12) type 1 fimbriae in *S. flexneri*, have their expression determined by changes of environment and culture conditions, with two phenotypes that alternate: a fimbriate and a nonfimbriate phase. During this last one, the bacterial cells own the necessary genetic information to the synthesis of the fimbriae doing it only, however, when multiplying themselves in certain environment conditions (6, 28).

The study of the pathogenesis of infection by *Shigella* has resulted in the development of many experimental models, not all simulating adequately the ways and conditions of the human infection. Nevertheless, the model of guinea-pig keratoconjunctivitis has been intensely utilized because it presents a great resemblance to the human infection (5, 20).

In this investigation, the infective capacity of the fimbriate and nonfimbriate phases of a virulent strain of *S. flexneri* was compared, using the guinea-pig keratoconjunctivitis (KC) as a experimental model. The effect of D-mannose or nonagglutinating antibodies for surface antigens on the virulence of the fimbriate phase was also evaluated.

Material and Methods

Bacterial strain — *Shigella flexneri* 3, strain 1225/53, was originally obtained from Instituto Oswaldo Cruz culture collection and biochemically identified as previously described (8). To infection experiments a KC-positive newly-passed culture was stored in GC-broth (Difco) with 20% (v/v) glycerol at -25°C. The long-term storage was performed in ampoules or tubes with semi-solid nutrient agar.

Fimbriate (P^+) and nonfimbriate (P^-) phases — The procedures used were similar to those described by Duguid & Gillies (6). The P^+ phase was obtained by serial passages in nutrient broth and P^- was obtained by serial passages in the same medium, with 2% Bacto-agar (Difco).

Antisera — The somatic antiserum (O antiserum) was prepared with P^- , as recommended by Edwards & Ewing (8). The fimbriate phase antiserum (OP $^+$ antiserum) was prepared accord-

ing Gillies & Duguid (12). From it, by absorption (8) with P^- was obtained a specific fimbrial antiserum (P antiserum). Antisera titrations were carried out by tube agglutination tests, according Gillies & Duguid (12). Absorption of OP $^+$ antiserum with P^- reduced antibody titers to P^- from 2,560 to <20. Antibody titer to P^+ remained at 1,280, both before and after absorption. O antiserum contained a titer of 2,560 to P^- and titers of 2,560 and 320 to P^+ suspensions submitted or not to heat (100°C, 2h), respectively.

Envelope antigens — The search of smooth colonies innaglutinable in O antiserum (K-rich colonies) was performed according Edwards & Ewing (8). Also, OK antiserum was prepared and titrated with P^- suspensions heated (100°C, 2h) or not, by tube agglutination tests.

Phase characterization tests (PCT) — The somatic and fimbrial antigens of P^+ and P^- suspensions were controlled by some tests, performed in glass slides: (i) Hemmagglutination (HA) of guinea-pig erythrocytes; (ii) Bacterial agglutination (BA) carried out with P antiserum, O antiserum and acriflavine; (iii) HA-inhibition by D-mannose, P antiserum and O antiserum.

In the first four tests, identical drops of bacterial suspensions (10^{10} CFU/ml) were mixed respectively with: 3% (v/v) guinea-pig erythrocytes in 0.85% physiological saline (PSS), P antiserum diluted 1:10 in PSS, O antiserum diluted 1:10 in PSS and 0.02% (w/v) neutral acriflavine (National Aniline Division) in PSS. The glass slide was rotated in a rocking motion for 3min and the occurence of HA or BA strong and complete, with a limpid supernatant, was admitted as a positive test.

In the HA-inhibition tests, a drop of bacterial suspension was directly mixed with 3% guinea-pig erythrocytes with 1% (w/v) D-mannose (Merck) or 1 drop of bacterial suspension was mixed with identical drop of P or O antiserum diluted 1:10 in PSS and incubated at room temperature for 10min with rocking of the slide. Thereafter, 1 drop of a 3% suspension of guinea-pig erythrocytes (without D-mannose) was added to the mixture and the HA ability was tested as described above.

Electron microscopy — P^+ and P^- suspensions were treated with 0.25% formaldehyde in PSS, thorougly washed in PSS, submitted to negati-

ve staining by phosphotungstic acid and observed in a Phillips EM-301 microscope.

Purified antigens — The fimbrial antigen (P antigen) was obtained as described by Brinton (3). The lypopolysaccharide (O antigen) was obtained of P⁺, according Young & col. (30).

Sensitized erythrocytes — Guinea-pig and human (ORh⁻) erythrocytes were sensitized by P and O antigens, respectively. Ten per cent (v/v) erythrocyte suspensions were prepared in PSS with suitable antigen dilutions (P antigen = 1:5; O antigen = 1:10), rotated (60-80rpm) for 15min at room temperature and 3ml-volumes were centrifuged (200xg), washed twice in PSS and the erythrocytes immediately used in the absorption tests.

Papain-treated globulin (FAB) — Globulin fraction of OP⁺ antiserum were prepared by precipitation with ammonium sulfate (4). Proteins precipitating at 35% saturation were collected by centrifugation, redissolved and reprecipitated three times. The final precipitate was dialyzed and the globulin's concentration determined (13). The enzymatic digest was made with papain (NF VIII, Difco), according Porter (24).

The antigen-binding non-agglutinating activity of FAB was evaluated by tube agglutination tests with P⁺ and P⁻ bacteria and by HA-inhibition of sensitized erythrocytes (O and P) exposed to homologous complete antibodies. The binding of FAB to bacterial and sensitized erythrocyte surfaces were searched by agglutination with caprine anti-rabbit globulin (Hoechst).

FAB absorptions — Three ml-volumes of FAB diluted 1:5 in PSS were mixed with sensitized erythrocytes and incubated 15min at 37°C, with occasional stirring. Limpid supernatants recovered after centrifugation (500xg) were collected and maintained at 4°C.

Animals — Albino guinea-pigs were eye-inoculated and daily observations were made for 1 week. Eyes without visible abnormalities were considered negative. From infected eyes, exsudate were streaked onto EMB agar (Difco) and *Shigella*-like colonies were biochemically and serologically identified.

Inoculum — P⁺ and P⁻ suspensions were prepared in PSS and adjusted by optical density mea-

surement (Spekol, ausJena). Pour-plate viable counts (VC) were carried out and 0.01ml was dripped onto the conjunctival surface of the animals; the experimental inocula contained from 10⁸ to 10² colony-forming units (CFU).

Infectious Dose 50% (ID50) — Were performed according Reed & Muench method, with two independent experiments to each bacterial phase. To each animal, only one eye was challenged, the opposite eye receiving PSS.

P⁺ phase virulence and D-mannose — Known volumes of P⁺ suspension (10¹⁰CFU/ml) were centrifuged (1,000xg) and the supernatant substituted by identical volumes of PSS with 2% (w/v) D-glucose (Merck) or D-mannose (Merck). The suspensions were incubated 5min at room temperature and VC and PCT were performed again. The left eyes of each of 20 animals were challenged with D-glucose-treated inoculum while the opposite eyes received D-mannose-treated inoculum.

P⁺ virulence and FAB — Known volumes of P⁺ suspension (10¹⁰CFU/ml) were centrifuged (1,000xg) and the supernatant substituted by FAB diluted 1:5 in PSS. The suspensions were incubated 15min at 37°C, with occasional stirring, and VC and PCT were performed again. The left eye of each animal was challenged with FAB-treated inoculum while the opposite eye received a no-treated P⁺ inoculum.

FAB absorptions and P⁺ virulence — Experiments were performed as above, but using no-absorbed FAB, FAB/O, FAB/P and FAB/O-P. To each absorbed FAB-treated bacterial suspension, one of the eyes of 10 animals were inoculated, except to FAB/O-treated suspension, where 12 animals were used. The opposite eyes, in every animal, were inoculated with no-absorbed FAB-treated suspension.

Fimbrial HA-inhibition by FAB — P⁺ suspensions, treated or not by FAB 1:5, were serially diluted in PSS, from 1:2 to 1:10,240. A identical volume of 1% guinea-pig erythrocytes was added and the tubes were agitated. Tests were read after overnight incubation at room temperature. The last bacterial dilution at which HA occurred was considered the end point and titers were expressed as the reciprocal of the bacterial dilution.

Results

Antisera and search of envelope antigens — A striking difference was observed in the agglutinating titers of O antiserum against P⁺ (1:320) or P⁻ (1:2,560) phases and the effect of the heating on the fimbriae of the microorganism. In the same way, the titers of OP⁺ antiserum before (1:2,560) and after (<1:20) the absorption with P⁻ phase certify the specificity of the resulting P⁻ antiserum. With regard to envelope antigens, they were not detected in the 1225/53 strain.

Characterization of the P⁺ and P⁻ phases — In the Table 1, the behavior of P⁺ phase when submitted to the PCT is demonstrated. In Figure 1 are exhibited eletronic microphotographs of cultures admittedly in P⁺ phase (Figure 1a) or P-phase (Figure 1b) according to the PCT, appearing solely in the first figure fibrous structures with typical aspect of the fimbriae of type 1.

Figure 1 — Electron micrographs of (a) P⁺ and (b) P⁻ cells of *S. flexneri* 1225/53. Negative staining with phosphotungstic acid. Original magnification $\times 25,000$

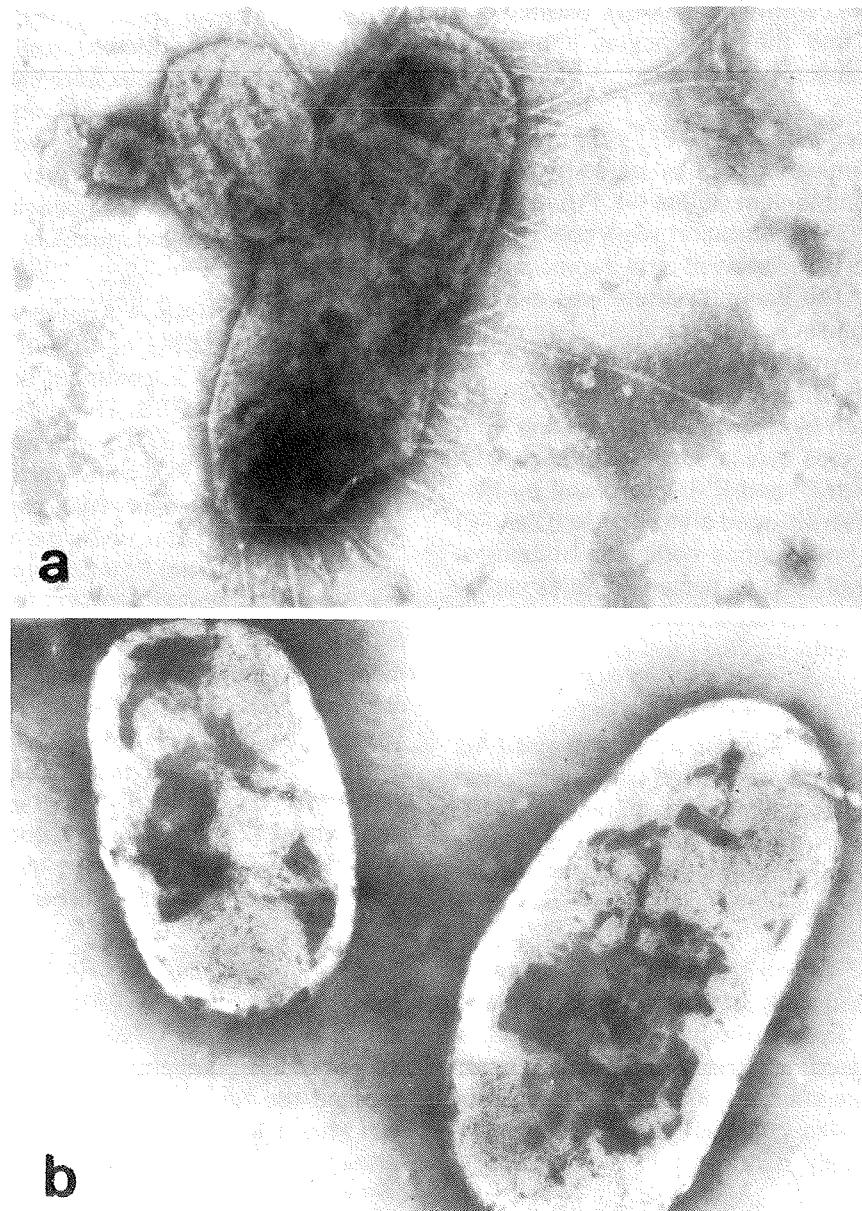


Table 1 — Comparison of P⁺ and P⁻ phases reactions in some selected tests

Tests	<i>S. flexneri</i> 1225/53	
	P ⁺ phase	P ⁻ phase
HA of 3% guinea-pig erythrocytes	+	-
BA by P antiserum	+	-
BA by O antiserum	(+)	+
BA by 1:1,000 acriflavine	-	-
HA — blocking by 0.5% D-mannose	+	ND
HA — inhibition by P antiserum	+	ND
HA — inhibition by O antiserum	-	ND

(+) = delayed positive reaction
+ = positive reaction (or blocking)
- = negative reaction (or no blocking)
ND = not done

Determination of the ID₅₀ — In the Table 2, in spite of the small difference in the challenge-inoculum practically occurs a superposition of P⁺ phase results, varying around 10^{5.7} — 10^{6.0} CFU. To P⁻ phase the ID₅₀ places itself between 10^{7.2} — 10^{7.7} CFU.

P⁺ phase virulence and D-mannose — In the Table 3, compared with the control-eyes (inoculum in D-glucose) a sharp decrease in the infectivity (20%) of P⁺ phase treated by D-mannose has occurred. Before and after the addition of D-mannose or D-glucose to standard suspension, the VC values were identical (7-9 × 10⁹ CFU/ml). With regard to the PCT, an HA inhibition was only detected in the bacterial suspension containing D-mannose.

Table 3 — Effects of D-mannose and D-glucose on the P⁺ phase virulence to guinea-pig eyes

Animals	P ⁺ phase in (*)	
	D-mannose (right eye)	D-glucose (left eye)
1	-	+
2	-	+
3	+	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	+	+
8	+	+
9	+	-
10	-	+
11	-	+
12	-	-
13	-	+
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	+
18	-	+
19	-	+
20	-	-
Total (\$) (%)	4/20 (20%)	14/20 (70%)

(*) = inocula with 9 × 10⁷ CFU

(\\$) = infected/inoculated eyes

+ = Keratoconjunctivitis (KC)-positive eye

- = KC-negative eye

P⁺ phase virulence and FAB — The dilution of FAB selection (1:5) has promoted an effective link of FAB fragments to bacterial cells without agglutinating effect. P⁺ suspensions treated by FAB present a reduction of their infectivity (Table 4) when compared with nontreated

Table 2 — Comparison of the ID₅₀ to P⁺ and P⁻ phases of *S. flexneri* 1225/53

Challenge Inocula (*)	<i>S. flexneri</i> 1225/53			
	P ⁺ phase		P ⁻ phase	
	1 st assay	2 nd assay	1 st assay	2 nd assay
10 ⁸	ND	ND	3/2	5/0
10 ⁷	5/0 (\\$)	4/1	1/4	2/3
10 ^{6.2}	ND	5/0	ND	ND
10 ⁶	2/3	4/1	0/5	0/5
10 ^{5.2}	ND	0/5	ND	ND
10 ⁵	1/4	0/5	0/5	0/5
10 ^{4.2}	ND	0/5	ND	ND
10 ⁴	0/5	ND	0/5	0/5
10 ³	0/5	ND	ND	0/5
10 ²	0/5	ND	ND	ND
ID 50	10 ⁶	10 ^{5.7}	10 ^{7.7}	10 ^{7.2}

(*) viable counts

ND = not done

(\\$) infected / non-infected animals

Table 4 — Effect of FAB treatment on the P⁺ phase virulence to guinea-pig eyes

Animals	P ⁺ phase in (*)	
	PSS (right eye)	FAB (left eye)
1.	+	+
2.	+	-
3.	+	+
4.	+	+
5.	+	-
6.	+	-
7.	-	-
8.	+	-
9.	+	-
10.	+	-
11.	+	-
12.	-	-
13.	+	-
14.	+	+
15.	+	+
Total (§) (%)	13/15 (87%)	5/15 (33%)

(*) = inocula with 3×10^8 CFU

(§) = infected/inoculated eyes

+ = KC+ positive eye

- = KC- negative eye

suspensions (30% and 80% of infections, respectively). Before and after the treatment by FAB, the VC were identical (10^{10} and 3×10^{10} CFU/ml) and as for the PCT, there was not detected any decrease in the HA of the suspension treated by FAB.

Neutralization of FAB protector effect — The P⁺ suspensions treated by FAB/OP proved to

be infective for 80% of the animals, twice more than in the opposite eyes inoculated by suspensions treated by not absorbed FAB. The result is similar to FAB/P (70%), while in the opposite eyes the data is quite different (30%). Nevertheless, the experimental data obtained with P⁺ phase in FAB/O was similar to the controls (Table 5).

Discussion

Antisera prepared for the 1225/53 strain have behaved as expected. The heating of P⁺ suspensions separated the fimbriae that were right afterwards removed by washing in PSS, which would explain the differences in O antiserum titers when being tested with heated suspensions or not. Duguid & Gilles (6) have demonstrated that fimbriae partially cover somatic antigen in a similar way to antigens K and Vi of certain enterobacteria. There were not detected envelope antigens in the 1225/53 strain. Besides, envelope antigens were only detected in the serologic types 2a and 6 in *S. flexneri* (8).

Simple tests adequate to the detection of fimbriae type 1 (3, 6, 12) were employed for the control of the obtainment of P⁺ or P⁻ suspensions. It was also researched the state of the O antigen since the obtainment of the P⁺ or P⁻ results in successive "in vitro" passages that could select rough forms. Therefore the direct agglutination by O antiserum and by acriflavin

Table 5 — Effects of various FAB-absorbed treatments on the P⁺ phase virulence to guinea-pig eyes

Animals	FAB (right eye)	FAB/O-P (left eye)	P ⁺ phase in (*)		FAB (right eye)	FAB/O (left eye)
			FAB (right eye)	FAB/P (left eye)		
1.	-	+	+	+	+	-
2.	-	+	+	+	-	+
3.	-	+	-	-	+	-
4.	-	+	-	+	-	+
5.	+	+	-	+	+	+
6.	-	-	-	+	+	+
7.	+	+	-	-	-	+
8.	+	+	+	+	-	-
9.	+	+	-	-	-	-
10.	-	-	-	+	-	+
11.	ND	ND	ND	ND	+	-
12.	ND	ND	ND	ND	+	-
Totals (§) (%)	4/10 (40%)	8/10 (80%)	3/10 (30%)	7/10 (70%)	6/12 (50%)	6/12 (50%)

(*) = inocula with 10^8 CFU

(§) = infected/inoculated eyes

ND = not done

+ = KC+ positive eye

- = KC- negative eye

was utilized without any evidence of deterioration of that antigen.

In the inoculation of animals there was taken care not to scarify the cornea and conjuctiva and small volumes of PSS were employed. Thus it was pretended to avoid to interfere with the free operation of the clearance mechanism of the region. Albino guinea-pigs were utilized because they permit, according to other authors (5), greater facility in the observation of ocular lesions.

Fimbriation and infectivity in S. flexneri 1225/53 — ID50 determination put in evidence the greater infectivity of P⁺ phase and brought the conviction that the virulence is not the direct consequence of the fimbriation, since thick inoculums of P⁻ phase also cause KC. On the other hand, no other differences were detected in regard to surface antigens between P⁺ and P⁻ phases.

However, the correlation demonstrated between the infectivity reduction and passage to P⁻ phase would be just a presumptive evidence that the lost function associates with the fimbriation, since P⁻ phase selection could equally lead to the selection of phenotypic characteristics (not always easily demonstrable) that could contribute to a reduction of the virulence (28). Therefore one has passed to the attainment of the selective blockade of the fimbrial adhesiveness, trying to measure its effect upon the P⁺ phase virulence.

The D-mannose would cause a specific blockade of the adhesiveness of the type 1 fimbriae of many enterobacteria (7, 18, 21, 22, 25, 26, 27), while the D-glucose, although structurely similar, is destituted of such action (21, 22, 25, 26, 27). The results obtained by the use of both carbohydrates were sufficiently clear to support the supposition that the fimbriae contribute to the greater infectivity of the P⁺ phase. The specific blockade of the fimbrial adhesiveness of the P⁺ suspension treated by D-mannose, evidenced "in vitro" by the inhibition of the HA of erythrocytes of guinea-pig would cause "in vivo" a decrease in the frequency of well succeeded infections.

After that, additional evidences by the utilization of antibodies oriented to surface antigens of 1225/53 have been tried. Complete antibodies would be accompanied by the inconvenient of causing bacterial agglutination and the consequent reduction of the real number of available germs to interact with the epithe-

liums. The problem was surpassed by treating the rabbit immunoglobulins by papain, which breaks the IgG in two fragments endowed with activity of antibody and monovalents and a third fragment corresponding to the portion Fc of the IgG (9, 24). In the same conditions, the IgM originates heterogeneous fragments (9).

By the control tests, the preparation that was obtained has revealed itself with specificity to the antigens O and P without any significant agglutinating activity. Additionally, the VC were always made before and after the incubation with FAB and there was never detected a reduction in the number of the viables that suggested agglutinating or bactericidal effect.

In regard to the results, a significative grade of protection to the challenged eyes with inoculums treated by FAB 1:5 was verified, and additional tests during which fimbriate inoculums were treated by FAB previously absorbed by antigens O, P or both, permit to conclude that the protector effect results from the presence of monovalent fragments of antibodies oriented to the *S. flexneri* fimbriae. Nonagglutinating antibodies oriented to the O antigen do not seem to perform any protective role.

Adhesiveness and its role in the virulence — The collection of the results suggests, to the fimbriae of the strain 1225/53 a valuable auxiliary role in the virulence, exerted during the early steps of the infectious process on the level of the interaction between microorganism and epithelial cells of the mucous membranes. The hydrophobicity conferred to the bacterial cells by the type 1 fimbriae (3, 21) would help its contact with the cellular surfaces and its coupling to the specific receptors. Recently were obtained evidences that the association of rough *Salmonella typhimurium* (strain 395 MR10) to HeLa cells (16, 17) and "in vitro" to mice intestinal mucosa (23) could be explained by the hydrophobicity and the negative charge of that strain.

Ogawa & col. (19) and Ogawa (20) have verified in *S. flexneri*, that only virulent germs adhered firmly to the surface of human cells, "in vitro", and admit that such fixation would be necessary to the induction of the subsequent events which culminate with the bacterial penetration. Bondarenko & col. (2), on the other hand, verified that the presence of type 1 fimbriae in *S. flexneri* increased its index of association to Hep-2 cells.

In keratoconjunctivitis experimental model, where physiological mechanisms of clearance operate with intensity (lacrimal flowing, continuous drainage of liquids, movement of the eye-lid), the greater adherence of P⁺ microorganisms to the epithelium of the cornea or conjunctiva, would result in smaller infectant doses, as expression of the high number of germs able to penetrate and multiply themselves intracellularly. In these conditions, factors that interfere with the normal activity of the adherence structures of the microorganism (D-mannose, specific antibodies) would reduce the number of germs that fix themselves to the epithelium, with a consequent abortion of the infection.

Correlation between the infectivity reduction of the P⁺ phase and the inhibition of fimbrial adhesiveness was obtained (evaluated by HA of guinea-pig erythrocytes) as much as by the D-mannose as by treatment by FAB. In this case, the qualitative test for HA, performed with thick bacterial suspensions, has revealed itself inadequate, demanding the utilization of quantitative technique. Probably, the FAB fragments associate themselves to different points of the fimbriae, just causing a partial occupation of the sites of connection to the cellular receptors and thus permitting the occurrence of HA when sufficiently thick bacterial suspensions are employed. Duguid & Gillies(6) and Duguid, Anderson & Campbell(7) showed that

proportions of fimbriate cells so reduced as much as 0.1% or 1% can promote discreet HA ever since thick bacterial suspensions are employed.

The data of the present investigation suggest the possible participation of the mediated adhesiveness by the type 1 fimbriae in the human infection by *S. flexneri*. However, such possibility must be submitted to experimental proof, in models that reproduce more faithfully the conditions that prevail in the intestinal mucous. On the other hand, the behavior of antibodies specifically guided to the fimbrial antigen of the microorganism suggests a possible protector mechanism acting in the early stages of the interaction between the parasite and the mucous membrane.

Acknowledgments

I thank Dr. Cláudio Armando Jürgensen (UFF) for his opportune criticism and stimulating discussions, Dr. Ivone Rocco Suassuna (UFRJ) for serologic characterization of the bacterial strain and Dr. Milden Rodrigues Santa Rosa, Dr. Revailza dos Santos Lopes and Dr. Angela Gonçalves da Silva from the Laboratory of Eletronic Microscopy of the Instituto de Microbiologia (UFRJ) for observation and photography of the bacterial suspensions.

References

1. Aly, R.; Shinefield, H.I.; Strauss, W.G. & Maibach, H.I. — Bacterial adherence to nasal mucosal cells. *Infect. Immun.*, 17:546-549, 1977.
2. Bondarenko, V.M.; Petrovskaya, V.G.; Maslova, T.N.; Pereverzev, N.A. & Burd, G.I.: — Significance of the capacity of *Shigella flexneri* to synthesize common pili for the development of dysentery infection. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 3:31-36, 1975.
3. Brinton, C.C. — Contributions of pili to the specificity of the bacterial surface, and a unitary hypothesis of conjugal infectious heredity, p.37-70. In: — Davis, B.D. & Warren, L., eds. — *The specificity of cell surfaces*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1967.
4. Cherry, W.B. — Immunofluorescence techniques. p: 29-44. In: — Lennette, E.H.; Spaulding, E.H. & Truant, J.P., eds. — *Manual of clinical microbiology*. 2. ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974.
5. Ciufecu, C. — Le test de la kérato-conjonctivite. *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 29:7-27, 1970.
6. Duguid, J.P. & Gillies, R.R. — Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli. *J. Path. Bact.*, 74:397-411, 1957.
7. Duguid, J.P.; Anderson, E.S. & Campbell, I. — Fimbriae and adhesive properties in *Salmonellae*. *J. Path. Bact.*, 92:107-138, 1966.
8. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — *Identification of Enterobacteriaceae*. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
9. Eisen, H.N. — Immunology — antibody structure: the immunoglobulins, p.405-446. In: — Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. & Wood, W.B., eds. — *Microbiology*. 2. ed. Hagerstown, Harper & Row, 1973.
10. Freter, R. — Studies of the mechanism of action of intestinal antibody in experimental cholera. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 27:299-316, 1969.
11. Gibbons, R.J. — Bacterial adherence in infection and immunity. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 4:49-60, 1973.
12. Gillies, R.R. & Duguid, J.P. — The fimbrial antigens of *Shigella flexneri*. *J. Hyg.*, 56:303-318, 1958.
13. Goldenberg, H. & Drewes, P.A. — Direct photometric determination of globulin in serum. *Clin. Chemistry*, 17:358-362, 1971.

14. Grinberg, L.D. & Gordon, M.A. — Further study of fimbrial antigens in *Enterobacteriaceae*. III — Distribution of the fimbrial phase in the genus *Shigella*. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 15:293-297, 1971.
15. Isaacson, R.E.; Fusco, P.C.; Brinton, C.C. & Moon, H.W. — In vitro adhesion of *Escherichia coli* to porcine small intestinal epithelial cells: pili as adhesive factors. *Infect. Immun.*, 21:392-397, 1978.
16. Kihlström, E. & Edebo, L. — Association of viable and inactivated *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR 10 with HeLa cells. *Infect. Immun.*, 14:851-857, 1976.
17. Kihlström, E. & Nilsson, L. — Endocytosis of *Salmonella typhimurium* 395 MS and MR 10 by HeLa cells. *Acta Path. Microb. Scand. Sect. B*, 85:322-328, 1977.
18. Ofek, I. & Beachey, E.H. — Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 22:247-254, 1978.
19. Ogawa, H.; Nakamura, A.; Nakaya, R.; Mise, K.; Honjo, S.; Takasaka, M.; Fujiwara, T. & Imaizumi, K. — Virulence and epithelial cell invasiveness of dysentery bacilli. *Japan. J. Med. Sci. Biol.*, 20:315-328, 1967.
20. Ogawa, H. — Experimental approach in studies on pathogenesis of bacillary dysentery — with special references to the invasion of bacilli into intestinal mucosa. *Acta Path. Jap.*, 20:261-277, 1970.
21. Old, D.C.; Corneil, I.; Gibson, L.F.; Thomson, A.D. & Duguid, J.P. — Fimbriation, pellicle formation and the amount of growth of *Salmonella* in broth. *J. Gen. Microbiol.*, 51:1-16, 1968.
22. Old, D.C. — Inhibition of the interaction between fimbrial haemmagglutinins and erythrocytes by D-mannose and other carbohydrates. *J. Gen. Microbiol.*, 71:149-157, 1972.
23. Perers, L.; Andaker, L.; Edebo, L.; Stendhal, O. & Tagesson, C. — Association of some enterobacteria with the intestinal mucosa of mouse in relation to their participation in aqueous polymer two-phase systems. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B*, 85:308-316, 1977.
24. Porter, R.R. — The hydrolysis of rabbit globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.*, 73:119-126, 1959.
25. Rivier, D.A. & Darekar, M.R. — Inhibitors of the adhesiveness of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Experientia (Basel)*, 31:662-664, 1975.
26. Salit, I.E. & Gotschlich, E.C. — Hemmagglutination by purified type 1 *Escherichia coli* pili. *J. Exp. Med.*, 146:1169-1181, 1977.
27. Salit, I.E. & Gotschlich, E.C. — Type 1 *Escherichia coli* pili: characterization of binding to monkey kidney cells. *J. Exper. Med.*, 146:1182-1194, 1977.
28. Swaney, L.M.; Liu, Y.P.; To, C.M.; To, C.C.; Ippen-Ihler, K. & Brinton, C.C. — Isolation and characterization of *Escherichia coli* phase variants and mutants deficient in type 1 pilus production. *J. Bacteriol.*, 130:495-505, 1972.
29. Williams, R.C. & Gibbons, R.J. — Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science*, 177:697-699, 1972.
30. Young, V.M.; Gillem, H.C.; Massey, E.D. & Baker, H.J. — A study on the detection and specificity of antibodies to *Shigella flexneri* types using preserved polysaccharide-sensitized human erythrocytes. *Am. J. Public. Hlth.*, 50:1866-1872, 1960.

Isospora spp.: estudo sobre a ocorrência na espécie felina, na cidade de São Paulo

Saemi Ogassawara

Sérgio Benassi

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal,
Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia USP, Cidade Universitária
05508 São Paulo SP, Brasil

Mitika Kuribayashi Hagiwara
& Carlos Eduardo Larsson

Departamento de Patologia e Clínica Médicas,
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP

Resumo

O exame coproparasitológico de 103 animais da espécie felina, de idades, raças e sexos diferentes, oriundos de diversas áreas da cidade de São Paulo, revelou 18 (17,5%) amostras positivas para oocistos de *Isospora* spp. Estes foram identificados como sendo de *I. felis* (13,6%), *I. rivolta* (4,8%) e *Isospora* sp. (1%). Em 1,9% das amostras fecais, uma infecção mista, representada por *I. felis* e *I. rivolta*, foi encontrada. Alguns animais, portadores de *Isospora* spp., apresentaram sintomas de distúrbios digestivos, porém não foi possível chegar a qualquer conclusão sobre o papel patogênico, desempenhado pelos protozoários, porque os gatos apresentaram também outras doenças concorrentes.

Summary

Isospora spp.: studies of its prevalence in domestic cat in the city of São Paulo

The examination of 103 fecal samples from cats of different ages, breeds and of both sexes, from different areas of the city of São Paulo, revealed 18 (17,5%) positive samples for *Isospora* spp. oocysts. They were identified as *I. felis* (13,6%), *I. rivolta* (4,8%) e *Isospora* sp. (1%). In 1,9% of the fecal samples a mixed infection represented by *I. felis* and *I. rivolta* was found. Some animals with *Isospora* infection showed symptoms of digestive disorders, but no conclusion could be withdrawn over the pathogenic role played by the protozoa once those cats also presented other concurrent diseases.

Introdução

Em cães, é relativamente frequente o encontro de infecção por *Isospora* spp. e vários autores têm se dedicado ao estudo de sua ocorrência no Brasil*. No entanto, poucos são os trabalhos sobre o mesmo gênero de parasita em gatos.

A primeira constatação de *Isospora* em gatos foi feita por Barreto & Almeida (3) no Rio de Janeiro; esses pesquisadores registraram o encontro de *I. felis*. A mesma espécie foi posteriormente observada por Bastos (4), em Salvador e por Amaral & col. (1), em São Paulo.

Nery-Guimarães & Lage (11) verificaram a prevalência de 24% de *I. felis*, 14,4% de *I. rivolta* e 15,2% de infecção mista, por ambas as espécies em gatos, no Estado do Rio de Janeiro. Barbosa & col. (2), em Goiânia, encontraram 76% de *I. felis*, 30% de *I. rivolta* e 20% de *I. bigemina*. Hatschbach & col. (8) observaram 20% de isosporas, em gatos, na cidade do Rio de Janeiro.

O objetivo do presente trabalho foi determinar a ocorrência, na cidade de São Paulo, das diversas espécies de *Isospora*. Além disso, tentar estabelecer a correlação entre a presença e as possíveis manifestações clínicas, nos animais positivos.

* Ogassawara, S.; Larsson; C.E.; Larsson, M.H.M.A. & Hagiwara, M.K. — Ocorrência de *Isospora* sp. em cães na cidade de São Paulo. Rev. Fac. Med. Vet. e Zootec. USP (no prelo).

Material e Métodos

Foram examinadas 103 amostras de fezes, de gatos, de diferentes raças, idades e de ambos os sexos, procedentes de diversas áreas da cidade de São Paulo. As fezes eram recebidas junto ao Ambulatório da Disciplina de Patologia e Clínica Médicas de Monogástrico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Os exames de fezes foram realizados com as técnicas de concentração por flutuação em sacarose ($d = 1,203$) e a de centrifugação em água-éter (7).

A identificação das espécies de *Isospora* foi feita após a esporulação dos oocistos, nas fezes colocadas em solução aquosa de bicromato de potássio a 2%, a 26°C. Os oocistos, uma vez esporulados, foram conservados em refrigeração, a 4°C. A mensuração dos oocistos esporulados foi realizada com a ocular micrométrica Zeiss-Wetzlar.

Resultados

Em 103 amostras de fezes de gatos examinadas, foram detectadas 18 (17,5%) amostras positivas para *Isospora* spp. Doze (11,7%) eram

oocistos de *I. felis*, 3 (2,9%) de *I. rivolta*, 1 (1%) de *Isospora* sp. e 2 (1,9%) de *I. felis* e *I. rivolta*, em associação.

Nas Tabelas 1, 2 e 3 figuram os resultados obtidos.

Assim, na Tabela 1, foram relacionados o número e a porcentagem de animais positivos em função das diferentes espécies de *Isospora*.

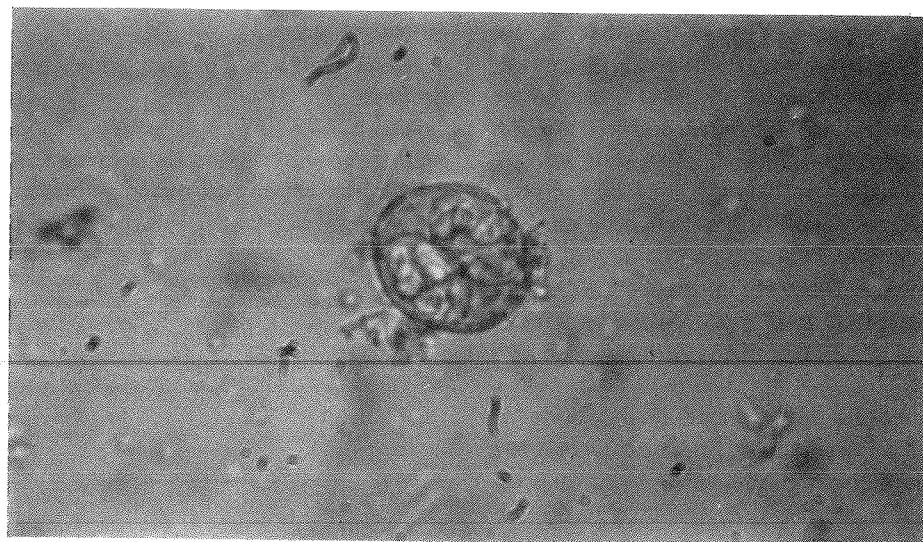
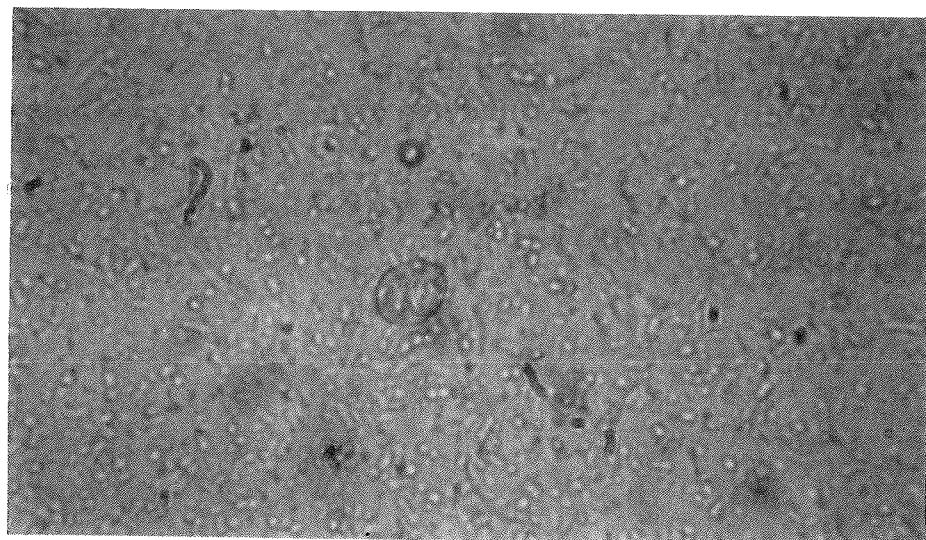
Tabela 1 — Espécies de *Isospora*, número e porcentagem de animais positivos

Espécies	Animais positivos	
	Nº	%
<i>I. felis</i>	12	11,7
<i>I. rivolta</i>	3	2,9
<i>Isospora</i> sp.	1	1,0
<i>I. felis</i> e <i>I. rivolta</i>	2	1,9
Total	18	17,5

Na Tabela 2, foram dispostas as dimensões e a morfologia de oocistos e esporocistos de *Isospora* spp. E por fim, na Tabela 3, a raça, idade em meses, o sexo dos animais, bem como o diagnóstico clínico e o resultado dos exames parasitológicos.

Figura 1 — Oocisto esporulado de *I. felis* nas fezes de gato. Aumento original 400X



Figura 2 — Oocisto esporulado de *I. rivolta* nas fezes de gato. Aumento original 400X**Figura 3** — Oocisto de *Isospora* sp. nas fezes de gato. Aumento original 400X**Tabela 2** — Dimensões e morfologia de oocistos e esporocistos de *Isospora* spp***

Espécies	Dimensões		Morfologia
	oocistos* (μm)	esporocistos* (μm)	
<i>I. felis</i>	37,7–45,5 x 28,3–33,0 (41,5 x 31,2)	20,4–26,7 x 17,3–20,4 (22,7 x 19,0)	oocisto ovóide-largo, esporocisto elíptico com corpúsculo residual.
<i>I. rivolta</i>	22,0–28,3 x 18,8–25,1 (24,5 x 22,0)	15,7–20,4 x 9,4–14,1 (18,0 x 11,9)	oocisto ovóide ou arredondado, esporocisto elipsóide com corpúsculo residual.
<i>Isospora</i> sp.	12,6–14,1 x 10,4–12,6 (12,9 x 11,6)	**	oocisto esférico ou oval, esporocisto elipsóide com corpúsculo residual.

* Mensuração de 50 elementos

** Não foi realizada a mensuração

*** Figuras 1, 2 e 3

Discussão

No presente trabalho, foram identificadas duas espécies de *Isospora*: *I. felis* e *I. rivolta*. A terceira espécie citada como *Isospora* sp., corresponde, na realidade, a espécie inicialmente denominada de *I. bigemina* (Stiles, 1891) Luhe, 1906 (13). Essa denominação tem sido utilizada indistintamente para várias espécies de coccidiás cujos oocistos eram menores do que os de *I. felis* e os de *I. rivolta*.

Os oocistos de *I. bigemina* eram encontrados nas fezes, sob duas formas: esporulada e não esporulada. Os oocistos não esporulados, à luz dos conhecimentos atuais, podem pertencer a três gêneros de parasitas: *Toxoplasma*, *Hammondia* e *Besnoitia* (9). Os oocistos esporulados pertencem, por seu lado, a várias espécies de *Sarcocystis* (9, 10).

As dimensões observadas $12,9 \times 11,6\mu\text{m}$, correspondem a dois gêneros, *Toxoplasma* e *Hammondia*, havendo, pois, necessidade de identificação por meios biológicos. Preferimos, por ora, denominar a entidade *Isospora* sp. A identificação de oocistos de *Toxoplasma* é importante, do ponto de vista da saúde pública.

A ocorrência de *Isospora* spp. em 17,5% de gatos, na cidade de São Paulo, aproxima-se

dos dados obtidos por Hutschbach & col. (8), de 20%, na cidade do Rio de Janeiro. Em Goiânia (2), bem como no Rio de Janeiro (11), foi observada alta prevalência de *Isospora* spp., 90% e 50,9%, respectivamente, diferindo, portanto, de nossas observações.

Analizando os dados constantes da Tabela 3, podemos notar que, entre os animais positivos, a infecção prevaleceu naqueles de até um ano de idade. Foi observada também que *Isospora felis* é a mais comum dentre as três espécies.

Entre os 18 animais positivos para *Isospora* spp., seis apresentaram quadro de diarréia, mas estavam acometidos de outras doenças específicas (Tabela 3) e somente um teve enterite de natureza não determinada, a não ser pela presença de *I. rivolta*. Nove animais eram assintomáticos, aparentemente simples portadores de infecção.

A ação patogênica de espécies de *Isospora*, nos carnívoros domésticos, ainda constitui assunto bastante controvertido (5, 6, 12). A relação entre representantes de *Isospora* e os outros agentes etiológicos de doença também ainda não foi estabelecida.

Há, portanto, necessidade de maiores estudos sobre o problema Isosporose (íase) sob condições naturais e experimentais.

Tabela 3 — Diagnóstico clínico e resultado dos exames coproparasitológicos em gatos de diferentes raças, idades e de ambos os sexos

Nº	Raça	Sexo	Idade (meses)	Diagnóstico Clínico	Exame Coproparasitológico	
					Helmintos	Protozoários
1	Siamês	M	36	Dermatomicose	—	<i>I. rivolta</i>
2	SRD	M	18	Rinotraqueite	—	<i>I. felis</i> - <i>I. rivolta</i>
3	SRD	M	36	Enterite	—	<i>I. rivolta</i>
4	Siamês	F	24	Panleucopenia	—	<i>I. felis</i> - <i>I. rivolta</i>
5	SRD	F	5	Enterite verminótica	<i>Ancylostomidae</i>	<i>I. rivolta</i>
6	Siamês	F	4	Raquítismo	—	<i>I. felis</i>
7	Siamês	F	24	Panleucopenia	<i>Ancylostomidae</i>	<i>Isospora</i> sp.
8	SRD	F	2	Enterite verminótica	<i>Toxocara</i> sp.	<i>I. felis</i>
9	Siamês	M	12	Panleucopenia	—	<i>I. felis</i>
10	SRD	M	1	*	—	<i>I. felis</i>
11	SRD	M	6	*	—	<i>I. felis</i> - <i>Sarcocystis</i>
12	SRD	F	5	*	—	<i>I. felis</i> - <i>Sarcocystis</i>
13	SRD	F	4	*	—	<i>I. felis</i> - <i>Sarcocystis</i>
14	Siamês	F	42	*	—	<i>I. felis</i>
15	SRD	M	2	*	<i>Dipylidium</i> sp.	<i>I. felis</i>
16	SRD	F	3	*	—	<i>I. felis</i>
17	SRD	F	3	*	—	<i>I. felis</i>
18	SRD	M	8	*	—	<i>I. felis</i>

* = Assintomático

SRD = Sem Raça Definida

M = macho

F = fêmea

— = negativo

Referências Bibliográficas

1. Amaral, V.; Campedelli, O.; Rebouças, M.M. & Birgel, E.H. — Presença de *Isospora felis* Wenyon, 1923 em *Felis catus domesticus* de São Paulo, Brasil. Rev. Soc. Paul. Med. Vet., 4:77-81, 1968.
2. Barbosa, W.; Fernandes, W.J.; Pinheiro, Z.B.; Teixeira, A.A. & Oliveira, G.S.C. — Coccídios encontrados em felinos (*Felis catus domesticus*) de Goiânia: estudo de sua biomorfologia. Rev. Pat. Trop., 2:311-319, 1973.
3. Barreto, J.F. & Almeida, J.L. — Primeiras observações sobre a presença de *Isospora felis* Wenyon, 1923 (*Protozoa-Eimeridida*) em felídeos no Brasil. Bol. Soc. Bras. Med. Vet., 7:357-360, 1937.
4. Bastos, W.D.A. — Ocorrência de *Isospora felis* Wenyon, 1923 em felinos de Salvador-Bahia, Brasil. Bol. Inst. Biol. Bahia, 6:42-45, 1962-1963.
5. Dubey, J.P. — A review of *Sarcocystis* of domestic animals and of other Coccidia of cats and dogs. Javma, 169:1061-1078, 1976.
6. Dubey, J.P. & Streitel, R.H. — *Isospora felis* and *I. rivolta* infections in cats induced by mice or oocysts. Brit. Vet. J., 132:649-651, 1976.
7. Ferreira, L.F.; Morteo, R.E. & Silva, J.R. — Padronização de técnicas para exame parasitológico das fezes. J. Bras. Med., 6:241-257, 1962.
8. Hatschbach, P.I.; Ribeiro, S. & Ribeiro, L.A.R. — Incidência de endoparásitos em gatos da cidade do Rio de Janeiro. Anais do XV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Rio de Janeiro, p. 156, 1976.
9. Heydorn, A.O. — The cat as final host for cyst forming coccidia. Berl. Munch. Tierarztl. Wschr., 92:214-220, 1979.
10. Levine, N.D. — Nomenclature of *Sarcocystis* in the ox and sheep and of fecal coccidia of the dog and cat. J. Parasitol., 63:36-51, 1977.
11. Nery-Guimarães, F. & Lage, H.A. — Prevalência e ciclo evolutivo de *Isospora felis* Wenyon, 1923, e *I. rivolta* (Grassi, 1879) Wenyon, 1923 em gatos. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 71:43-66, 1973.
12. Prescott, C.W. — Parasitic diseases of the cat in Australia. Veterinary Review, 12:15-16, 1972.
13. Wenyon, C.M. — Protozoology: a manual for medical men, veterinarians and zoologists. London, Baillière, Tindall & Cox, 1926.

Produção de biomassa de *Rozites gongylophora* visando emprego como complemento alimentar

Henrique S. Poltronieri
& Alcides Serzedello

Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências UNESP,
Caixa Postal 178,
13500 Rio Claro SP, Brasil

Resumo

Foi feito o isolamento do fungo *Rozites gongylophora* a partir de esponjas de ninhos de formigas cortadeiras do gênero *Atta*. Tentativas para desenvolvimento micelial, pelo método submerso, não deram resultado, sendo que o cultivo de superfície, em meio líquido com material sólido e nutritivo, foi o que apresentou melhor desenvolvimento micelial. Meio totalmente sintético não conseguiu até o momento, proporcionar crescimento micelial satisfatório, enquanto que meios contendo extrato de malte, extrato de carne, peptona ou melâço, sempre apresentaram crescimento micelial. Meio de malte com pedaços de côco permitiu o desenvolvimento micelial de até 37,41g/l por crescimento em superfície. Meio de malte, com pedaços de batata, nas mesmas condições, deu rendimento de biomassa de até 40,97g/l. O teor de nitrogênio na matéria seca apresentou oscilação de 4,1% a 7,5% e o teor de proteína oscilou de 25,62% a 46,69%. A análise de proteína revelou a presença de, pelo menos, 16 aminoácidos.

Summary

Production of biomass of Rozites gongylophora regarding its use as complementary feed

Rozites gongylophora was recently isolated from the fungus garden of leaf-cutting ants belonging to the genus *Atta*. All efforts for mycelium growth by submerse culture were ineffective; otherwise the stationary culture with liquid medium and solid nutritive material gave the best mycelial growth. Synthetic medium has not yet yield mycelial growth, while media with malt extract, beef extract, peptone and molasses have always rendered growth. Mass culture up to 40.97g/l dry matter was achieved on medium of malt with potato pieces. Nitrogen content in dry matter was in the range of 4.1% to 7.5% and the protein content from 25.62% to 46.69. The analysis of protein indicated the presence of at least 16 aminoacids.

Introdução

Formigas cortadeiras, do gênero *Atta*, dependem, para o desenvolvimento, do cultivo de fungo cujas brotações servem-lhes de alimento. Trabalhos pioneiros de Moeller (7) descrevem o fungo, no ambiente natural, mostrando as partes miceliais que servem de alimento às formigas e o modo de convivência. Trabalhos posteriores (4, 5, 8), permitiram verificar que as formigas cortadeiras, no Estado de São Paulo, cultivam mais que um tipo de fungo.

No presente trabalho, foi feito o isolamento do fungo *Rozites gongylophora*, de ninhos de formigas cortadeiras e realizado o cultivo em laboratório. Dos três tipos de fungos isolados de ninhos, no gênero *Atta* (4, 5, 8), o *Rozites* tem

se apresentado, até o momento, como o de mais difícil desenvolvimento em meios de cultura líquidos, em laboratório. O objetivo visado foi o de encontrar meios de cultivo que fornecessem crescimento micelial satisfatório, com teores de proteína e aminoácidos essenciais, adequados à alimentação animal.

Material e Métodos

Foram tomadas pequenas peças das esponjas, em formicários de laboratório e de esponjas em ninhos do campo, com assepsia adequada e inoculadas em meios de cultura especiais, em placas de Petri e em tubos. O método de isolamento foi o mesmo seguido em trabalhos ante-

riores (4, 8). Repicagens sucessivas, com diluições, em placas e tubos, foram realizadas para obtenção das culturas puras.

Foram preparados vários meios de cultura para o melhor desenvolvimento micelial, num total de 74 meios diferentes.

É a seguinte a composição dos meios de cultura que deram origem às massas miceliais mencionadas neste trabalho:

Meio 1: Batata em pedaços, 30g; Água destilada, 100ml.

Meio 2: Batata em pedaços, 30g; Malte a 2%, 100ml.

Meio 3: Côco em pedaços (1, 6, 9), 30g; Malte a 2%, 100ml.

Meio 4: Batata em pedaços, 30g; Malte a 2% (desengordurado), 100ml.

Meio 10: Extrato de levedura, 0,5%; Triptona, 1,0% Melaço, 5,0%; Água destilada q.s.p., 100ml.

Meio 22: Sais minerais segundo Takata (10) — Melaço 5,0% em H₂O, 50ml; Filtrado do resíduo da obtenção do extrato de malte, 50ml.

Meio 26: Malte a 10%, 100ml.

Meio 51: Côco em pedaços (1, 6, 9), 30g; Malte a 4%, 100ml.

Foram feitos, também, meios de cultura líquidos, utilizando-se diferentes fontes de carbono, a saber: frutose, galactose, glicerol, glucose, lactose, maltose, mel de abelhas, sacarose e xilose, em concentrações variando de 1% a 10%. Todos os meios de cultura foram acertados para pH 5,0 com NaOH ou H₂SO₄ diluídos, conforme o caso.

Os meios de cultura, colocados em tubos ou frascos fechados com chumaço de algodão, foram esterilizados em autoclave a 127°C, pressão de uma atmosfera, durante 30 minutos.

As culturas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 500ml, contendo 100ml de meio líquido com pedaços de batata ou de côco (1, 6, 9), quando era o caso e deixados em sala incubadora, à temperatura ambiente, de 25°C ± 5°C. O tipo de cultura foi o de superfície ou cultura parada. O tempo máximo de cultivo foi de 125 dias.

O micélio, desenvolvido das culturas, foi recolhido, separado e lavado, por filtração a vácuo e colocado em estufa, a 105°C.

A determinação do nitrogênio total foi feita segundo o método Kjeldahl, semi-micro, modificado por Fontana (3).

Determinaram-se, também, no micélio, os teores de lipídios e de fibra (2), assim como o

de cinza, sendo este por aquecimento a 550°C, até obtenção de peso constante.

As análises quantitativas de aminoácidos foram feitas em analisador Beckman.

Culturas mistas com bactérias foram realizadas em placas de Petri, usando-se as seguintes espécies: *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus caseolyticus*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas denitrificans*, *Pseudomonas solanacearum*, *Salmonella typhi*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*. Para tanto, foi adotado o seguinte procedimento: inoculou-se o fungo *R. gongylophora* em placas de Petri, contendo meio sólido de extrato de carne e Sabouraud. Após o desenvolvimento do fungo — aproximadamente 10 dias — foram inoculadas as bactérias, no sentido da parede da placa de Petri, para o fungo no centro, de modo perpendicular.

Resultados e Discussão

O desenvolvimento micelial de *Rozites gongylophora*, em culturas puras tem se revelado bastante lento e a tentativa de incrementá-lo pelo processo de culturas mistas com bactérias não deu qualquer estímulo ao fungo, com as culturas experimentadas.

O crescimento em meio de malte com pedaços de côco resultou na formação de até 37,41g/l de biomassa, com teor médio de proteína de 46,69% e pelo menos 16 aminoácidos, com presença de 9 aminoácidos essenciais.

Meio de malte, com pedaços de batata, após longo tempo de crescimento também produziu até 40,97 gramas de biomassa por litro, conforme se vê pela Tabela 1.

Tabela 1 — Formação de biomassa conforme o meio de cultura e tempo de desenvolvimento

Meio de Cultura n.º	Idade da cultura (dias)	Biomassa micelial g/l
2	92	34,403
	83	40,977
3	83	24,603
	83	37,409

As Tabelas 2 a 5 apresentam todos os resultados obtidos nas análises de micélio, incluindo-se comparações com resultados de outros autores.

Tabela 2 — Conteúdo de aminoácidos de micélios de *Rozites gongylophora* obtidos em diversos meios de cultura e de "Fungo marron" (5): valores em mg/100g de matéria seca

Componentes	Rozites gongylophora Números dos meios de cultura								"Fungo marron" valor médio obtido em vários meios de cultura
	1	2	3	4	10	22	26	51	
Lisina	842	708	1073	617	777	268	645	529	436
Histidina	556	513	620	405	314	129	364	237	212
Arginina	624	576	890	515	456	272	841	562	331
Ácido Aspártico	1659	1623	2105	1356	1467	1016	2012	1492	863
Treonina	835	848	1063	730	638	280	508	576	370
Serina	1053	1071	1403	941	697	319	704	682	526
Ácido Glutâmico	2906	2284	4081	2521	3173	1093	2137	2181	1242
Prolína	681	579	770	605	997	720	1397	951	1199
Glicina	1032	1076	1376	917	707	398	863	916	512
Alanina	830	792	1032	682	723	300	770	474	931
Valina	762	809	1012	711	386	215	409	633	404
Metionina	117	94	152	95	79	33	158	57	42
Isoleucina	702	687	849	603	285	183	335	374	369
Leucina	826	839	1039	792	796	774	1205	1364	622
Tirosina	3396	3211	3604	2693	274	135	336	246	162
Fenilalanina	545	577	689	554	430	347	544	502	174

Tabela 3 — Porcentagem de umidade, lipídeos, cinza e fibra de micélio de *Rozites gongylophora* em diversos meios de cultura

Meio n.º	Umidade %	Lipídeo %	Cinza %	Fibra %
1	88,24	4,77	1,01	0,46
2	87,71	7,82	0,41	0,22
3	86,44	2,08	0,94	0,46

Outras substâncias usadas como fonte de carbono não apresentaram crescimento micelial digno de menção.

As biomassas miceliais, obtidas nos meios de cultura números 4, 10, 22, 26 e 51, apresentaram valores de diferença insignificante, com relação aos rendimentos dos meios números 1, 2 e 3, razão pela qual não são aqui apresentados.

Os melhores resultados de crescimento micelial foram obtidos em meios com pedaços de côco e de batata, colocados nos frascos Erlenmeyer, de modo a permitir que uma parte do côco ou da batata ficasse submersa e outra acima da superfície. Justamente na parte acima da superfície é que se processava o desenvolvimento do micélio. O côco contém Na, K, Ca, Mg, Cl, Fe, glicose, proteínas, fosfolipídios e os seguintes ácidos graxos: lâurico, mirístico, palmitico, esteárico, linoleico e oleico (1, 6, 9). A batata, por sua vez, também encerra nutrientes orgânicos e minerais.

O fungo não apresentou desenvolvimento em meios sintéticos, exigindo sempre fatores de crescimento, alguns deles ainda não identifi-

cados, provavelmente presentes no extrato de malte, no melaço, no extrato de carne e na polpa de côco e da batata, todos usados com relativo êxito nos meios de cultura.

O teor de proteína total do micélio atingiu 46,69%. Trata-se de valor que permite admitir o material como adequado para complementar rações de animais, como fonte alternativa de proteína. Ainda mais que se trata de proteína contendo quase todos os aminoácidos essenciais, em doses satisfatórias.

O tempo de desenvolvimento micelial de *Rozites gongylophora* em laboratório continua ainda sendo um dos problemas não resolvidos, sendo muito demorado, provavelmente por não estarem presentes os fatores de crescimento necessários. As observações sobre o crescimento do fungo em formicários de laboratório mostram as esponjas adquirindo aumentos em biomassa com rapidez muito maior que *in vitro*, em culturas puras.

Há, que se considerar o fator aeração da massa micelial no formicário, conseguido pelo tipo de construção do jardim de fungo pelas formigas, depositando partículas vegetais numa estrutura toda trabalhada, de modo a permitir intenso contato com o oxigênio do ar.

Os teores de aminoácidos encontrados no micélio seco, conforme Tabelas 4 e 5 indicam qualitativamente, material aproveitável para alimentação animal. Deixa, entretanto, um pouco a desejar, quando se compara com os fungos já citados nas Tabelas e com os valores apresentados pelos padrões da FAO.

Tabela 4 — Comparação dos teores de aminoácidos em alguns fungos, padrão de F.A.O.(5) e *Rozites gongylophora* obtido em diversos meios

Aminoácidos essenciais	Gramas de aminoácidos por 16g de nitrogênio proteico								
	<i>Morchella hortensis</i>	<i>Tricholoma nudum</i>	Fungo marron (5)	Padrão da F.A.O.	<i>Rozites gongylophora</i>				
					1	2	3	4	10
Lisina	5,38	6,56	1,09	4,20	2,35	1,97	2,99	1,72	2,51
Leucina	6,06	6,66	1,55	4,80	2,30	2,34	2,90	2,21	2,57
Isoleucina	3,45	3,15	0,92	4,20	1,96	1,91	2,37	1,68	0,92
Fenilalanina e Tirosina	5,31	3,70	0,840	—	11,00	10,57	11,98	9,06	2,37
Valina	3,86	3,89	1,01	4,20	2,12	2,25	2,82	1,98	1,25
Metionina + Cistina	2,21	1,66	—	—	—	—	—	0,93	—
Treonina	2,88	3,70	0,93	2,80	2,33	2,36	2,96	2,03	2,06
Triptofano	1,44	3,52	—	1,40	*				

* Não dosado em virtude do método de análise depender de hidrólise ácida que destroa o aminoácido.

Tabela 5 — Aminoácidos em micélios secos de *Rozites gongylophora* e de "Fungo marron" (5) em gramas de aminoácidos por 100g de nitrogênio

Aminoácido	<i>Rozites gongylophora</i>				Fungo marron	
	Meios de cultura					
	1	2	3	4		
Lisina	14,66	12,33	18,69	10,74	6,81	
Histidina	9,68	8,93	10,80	7,05	3,31	
Arginina	10,87	10,03	15,50	8,97	5,16	
Ac. Aspártico	28,90	28,27	36,67	23,62	13,43	
Treonina	14,54	14,77	18,51	12,71	5,78	
Serina	18,34	18,65	24,44	16,39	8,21	
Ac. Glutâmico	50,62	39,79	71,09	43,91	19,30	
Prolína	11,86	10,08	13,41	10,54	18,68	
Glicina	17,97	18,74	23,97	15,97	8,00	
Alanina	14,45	13,79	17,97	11,88	14,50	
Valina	13,27	14,09	17,63	12,38	6,31	
Metionina	2,03	1,63	2,64	1,65	0,656	
Isoleucina	12,23	11,96	14,79	10,50	5,76	
Leucina	14,39	14,61	18,10	13,79	9,62	
Tirosina	59,16	55,94	62,78	46,91	2,53	
Fenilalanina	9,49	10,05	12,00	9,65	2,71	

Nossa explicação, para esses teores baixos, nos aminoácidos essenciais, seria pelo crescimento ainda insatisfatório do micélio *Rozites gongylophora*, nos meios conseguidos em laboratório. Percebe-se, nitidamente, a falta de um ou mais fatores de crescimento no meio, imprescindíveis para o satisfatório crescimento do fungo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à firma Rações Anhanguera — Duratex S.A. (Campinas), pelas análises de aminoácidos efetuadas em seus laboratórios e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão de bolsa de mestrado a um dos autores (H.S.P.).

Referências Bibliográficas

1. Aliwalas, P.; Hopolito, D.G.; Alvares, L. & Domingo, J. — Mass culture of *Rhodotorula pilimanae* Hedrick & Burke (1951) in coconut-water medium. Philippine J. Sci., 97:57-72, 1969.
2. Association of Official Agricultural Chemists — Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 10th ed. Washington, 1965.
3. Fontana, P. — Considerações sobre a dosagem de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. Memórias do Inst. Oswaldo Cruz, 51:277-288, 1953.
4. Kiyan, C.; Corso, C.R.; Pagano, S.N.; Tauk, S.M.; Angelis, D.F. & Serzedello, A. — Isolamento de microrganismos de ninhos de formigas cortadeiras. Ci. e Cult., 21:564, 1969.
5. Kiyan, C. — Contribuição ao conhecimento do fungo marron isolado de ninhos de formigas cortadeiras do gênero *Atta*. Rio Claro, Fac. de Filos. Ciências e Letras, 1973. (Tese de Doutoramento).
6. Leal, M.T. — Biochemical study of coconuts. Rev. Bras. Farm., 49:259-261, 1968.
7. Moeller, A. — Die Pilzgaerten einiger sudamerikanischer Ameisen. Schimper's Botan. Mitt. Tropen, 6:127, 1893. In: — Viegas, A.P. & Zink, E.M. — As hortas de fungo de algumas formigas sul-americanas. Rev. Entomol. (Supl. nº 1):1-120, 1941.
8. Pagnocca, F.C.; Lelis, G.J.; Vidal, R.; Tauk, S.M.; Corso, C.R.; Kiyan, C.; Angelis, D.F.; Angelis, C. & Serzedello, A. — Isolamento de microrganismos de ninhos de formigas cortadeiras: estudos adicionais. Resumos do II Congresso Brasileiro de Microbiologia, p. 159, 1970.
9. Pillai, N.G. — Free amino-acids in coconut palms affected by root (wilt) disease. Current Sci., 34:63-67, 1965.
10. Shukla, J.P. & Dutta, S.M. — Production of fungal protein from waste molasses. Indian J. Technol., 5:27-28, 1967.

***Yersinia enterocolitica* fermentadora rápida de lactose: isolamento a partir de material de garganta**

Maria Regina F. de Toledo

*Escola Paulista de Medicina, Departamento de Microbiologia,
Rua Botucatu, 862/3º andar
04023 São Paulo SP, Brasil*

& Deise P. Falcão

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
Universidade Estadual Paulista
14800 Araraquara SP, Brasil*

Resumo

São relatados o isolamento e as características de uma amostra de *Yersinia enterocolitica* do sorotipo 0:5 fermentadora rápida de lactose. A amostra foi isolada de um indivíduo adulto, a partir de material de garganta, na cidade de São Paulo, Brasil.

Summary

Yersinia enterocolitica which ferments lactose rapidly: isolation from human's throat

The isolation and the characteristics of one strain of *Yersinia enterocolitica* serotype 0:5, which ferments lactose rapidly, are reported. The strain was isolated from a healthy human's throat in São Paulo, Brazil.

Apesar de *Yersinia enterocolitica* ser um microrganismo isolado com muita freqüência em várias regiões do mundo, poucos são os relatos de seu isolamento no Brasil. O primeiro isolamento foi descrito em nosso país a partir de abscessos hepáticos de macacos, em 1968 (Giorgi, W.; Matera, A.; Mollaret, H.H. & Pestana de Castro, A.F. — Arq. Inst. Biol., 36:123-127, 1969). Em 1976, foi isolada a primeira amostra de origem humana, das fezes de uma criança com quadro de apendicite (Piszolitto, A.C.; Falcão, D.P.; Shimizu, M.T.; Galvão, S.H.M. & Giraldini, E. — Contr. Microbiol. Immunol., vol. 5, p. 169-173, Karger, Basel, 1979). Posteriormente, outros casos humanos foram relatados em São Paulo (Fontes, C.F.; Toledo, M.R.F.; Reis, M.H.L.; Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. — Rev. Microbiol., 9:167-168, 1978) e no Rio de Janeiro (Stumpf, M.; Ricciardi, I.D.; Oliveira, N.; Sabará, A. & Bernhoeft, M. — Rev. Bras. de Pesquisas Med. Biol., 11:383-384, 1978).

A amostra de *Y. enterocolitica* descrita neste trabalho (28-78 EPM) foi isolada em abril de 1978, a partir de material de garganta, de um indivíduo adulto que não apresentava sinais de infecção e cuja flora estava sendo estudada após antibioticoterapia. O material foi semeado em placas de ágar sangue e MacConkey, incubadas a 37°C; a amostra foi isolada neste último meio onde desenvolveu colônias pequenas fermentadoras de lactose, após 24 horas de incubação. As provas bioquímicas, realizadas a 28°C e a 37°C, mostraram que a amostra apresenta comportamento típico de *Y. enterocolitica*, com exceção da fermentação da lactose em 24 horas (Tabela 1). A tipagem sorológica identificou-a como pertencente ao sorotipo 0:5. O antibiograma, realizado pelo método descrito por Bauer & col. (Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. — Amer. J. Clin. Path. Tech., Sect. 45:493-496, 1966), revelou ser a amostra sensível a tetraciclina, cloranfenicol, canamicina, polimixina, nitrofu-

rantoína, sulfonamidas, sulfazotrim, tobramicina, amicacina e gentamicina e resistente a cefalotina, ampicilina e carbenicilina.

A invasibilidade foi pesquisada em cultura de células HeLa, segundo o método descrito por Lee & col. (Lee, W.H.; McGrath, P.D.; Carter, P.H. & Eide, E.L. — Can. J. Microbiol., 23:1714-1722, 1977) e em olho de cobaio (Teste de Serény) (Serény, B. — Acta microbiol. Acad. Sci. hung., 2:293-296, 1955). Em células HeLa o teste foi negativo; no cobaio a amostra provocou intensa conjuntivite, que regrediu no 3º dia, não tendo sido observada a reação característica de ceratoconjuntivite, provocada por amostras virulentas de *Shigella*, mesmo observando-se as recomendações de Feeley & col. (Feeley, J.C.; Wells, J.G.; Tsai, T.F. & Puhr, N.D. — Contr. Microbiol. Immunol., vol. 5, p. 329-334, Karger, Basel, 1979) quanto às condições de crescimento da amostra (25°C e 48 horas de incubação).

A amostra de *Y. enterocolitica* 28-78 EPM fermenta a lactose rapidamente, característica pouco comum na espécie. A fermentação da lactose também foi observada por Cornelis & col. (Cornelis, G.; Bennett, P.M. & Grinsted, J. — J. Bacteriol., 127:1058-1062, 1976) em uma amostra de *Y. enterocolitica* isolada de gagan-

ta, tendo neste caso sido demonstrado que esta característica era codificada por um plasmídio auto-transferível por conjugação.

Tabela 1 — Reações bioquímicas apresentadas pela amostra de *Y. enterocolitica* 28-78 EPM

Teste	Reação
Redução de nitrato	+
Indol	+
VM	+
VP	-
Citrato de Simmons	-
Urease	+
H ₂ S	-
Fenilalanina	-
Motilidade 28°C	+
Motilidade 37°C	-
Lisina descarboxilase	-
Ornitina descarboxilase	+
Glicose ácido	+
Glicose gás	-
Lactose	+
Sacarose	+
Xilose	+
Rafinose	+

Temperaturas de incubação 28°C e 37°C, quando não especificadas.

+ reação positiva dentro de 1 a 2 dias

- reação negativa

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

CONTEÚDO

Volume 11

Janeiro-Março 1980

CONTENTS

Número 1

Fred Rapp & A.M. Colberg-Poley	1	<i>Latency and herpes simplex virus</i>
J.C. Dianese & R.K. Webster	12	<i>Effect of cations mono e divalentes sobre crescimento vegetativo e reprodução sexual de Ceratocystis fimbriata, com ênfase em Ca²⁺ e Mg²⁺</i>
Maria A. de Resende & Yêddo P. de Figueiredo	23	<i>Metabolismo oxidativo de formas de cultura de Fonsecaea pedrosoi</i>
Pedro M.P.C. Mota Charlotte H. Langenegger Rômulo Cerqueira Leite & Jerome Langenegger	29	<i>Micobactérias isoladas de suínos do Estado de Minas Gerais</i>
Magali A. Lopes & Deise Pasetto Falcão	34	<i>Aglutininas anti Yersinia enterocolitica e anti Yersinia pseudotuberculosis em soros humanos</i>
Milton de Uzedo Maria C.S. Ferreira Sandra S. Otto & Wilson C. de Araujo	41	<i>Concentrações inibitórias de cefoxitina sódica para amostras de enterobactérias e Staphylococcus aureus isoladas de infecções humanas no Rio de Janeiro</i>

Volume 11

Abril-Junho 1980

Número 2

Neusa Pereira S. Almada & Luiz R. Trabulsi	45	<i>Efeito da resistência a drogas no crescimento e virulência de amostras de Shigella e E. coli invasor</i>	<i>Effect of drug resistance in growth and virulence of Shigella and invasive E. coli strains</i>
Leslie C. Benchettit Armando A. Borges Neto	50	<i>Ocorrência de estreptococos beta hemolíticos do grupo A e de outros grupos sorológicos em infecções humanas no Rio de Janeiro</i>	<i>Occurrence of group A and nongroup A beta-hemolytic streptococci in human infections in Rio de Janeiro</i>
Agnes Marie Sá Figueiredo & César M. de Oliveira			
Regina L. de Oliveira & R. Alcantara Gomes	55	<i>Produtos de termo-degradação de açúcares em pH alcalino. I — Efeito letal de soluções de glicose-fosfato em Escherichia coli</i>	<i>Thermal degradation products of sugars in alkaline pH.I — Lethal effect of glucose-phosphate solutions on Escherichia coli</i>
Jocellem Mastrodi Salgado & Paulo C. T. de Carvalho	60	<i>Fungos toxicogênicos associados a cereais. 1 — Levantamento da micoflora associada a milho, trigo e arroz</i>	<i>Toxigenic fungi associated to grains. 1 — Survey of microflora associated to corn, wheat and rice</i>
Rasmy M. Attia & Rawia F. Gamal	64	<i>Propriedades da celulose C_x (B-1-4-glucano 4-glucano hydrolase, 3.2.1.4.) obtida de Aspergillus niger R-1237</i>	<i>Enzymatic properties of cellulase C_x from a local isolate of Aspergillus niger R-1237</i>

Volume 11

Julho-Setembro 1980

Número 3

Maria L. C. Carvalhal Beatriz Ribas Castellani & Flávio Alterthum	71	<i>Efeito de antibióticos polínicos 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 Saccharomyces cerevisiae 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>

Volume 11 Outubro-Dezembro 1980 Número 4

Laurinda A. Soares Octavio A.C. Pereira & Osmane Hipólito	105	<i>Caracterização da primeira linhagem de vírus da laringotraqueite infecciosa (ILTV) no Brasil</i>	<i>Characterization of the first strain of infectious laryngotracheitis virus (ILTV) in Brazil</i>
Marcelo Magalhães Adelma Véras & Marlene Andrade	110	<i>Comparação entre "swabs" uretrais e sedimentos urinários no isolamento de agentes causais de uretrites</i>	<i>Comparison of urethral swabs and urinary sediments for the isolation of causal agents of urethritis</i>
M. Adelaide S. da Cunha Ítalo Suassuna & Ivone Rocco Suassuna	113	<i>Níveis de sensibilidade "in vitro" de <i>Salmonella typhi</i> isolada no Brasil, no período de 1930 a 1973, a antimicrobianos de emprego clínico</i>	<i>In vitro sensitivity levels of <i>Salmonella typhi</i> isolated in Brazil, from 1930 to 1973, to antimicrobial drugs of clinical use</i>
João R.C. Andrade	117	<i>Papel da adesividade fimbrial na ceratoconjuntivite experimental por <i>Shigella flexneri</i></i>	<i>Role of fimbrial adhesiveness in experimental guinea-pig keratoconjunctivitis by <i>Shigella flexneri</i></i>
Saemi Ogassawara Sérgio Benassi Mitika K. Hagiwara & Carlos Eduardo Larsson	126	<i>Isospora spp: estudo sobre a ocorrência na espécie felina, na cidade de São Paulo</i>	<i>Isospora spp: studies of its prevalence in domestic cat in the city of São Paulo</i>
Henrique S. Poltronieri & Alcides Serzedello	131	<i>Produção de biomassa de Rozites gongylophora visando emprego como complemento alimentar</i>	<i>Production of biomass of <i>Rozites gongylophora</i> regarding its use as complementary feed</i>
Maria Regina F. de Toledo & Deise P. Falcão	136	<i><i>Yersinia enterocolitica</i> fermentadora rápida de lactose: isolamento a partir de material de garganta</i>	<i><i>Yersinia enterocolitica</i> which ferments lactose rapidly: isolation from human's throat</i>

