

**Volume 12 Número 1 Jan.-Mar. 1981**

**Revista de Microbiologia**

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo — Brasil

Revista de Microbiologia  
Volume 12 Número 1 Jan.-Mar. 1981





## 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

<b>Diretoria</b>	Presidente João S. Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Secretário Geral Maria Therezinha Martins CETESB Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 05459 São Paulo SP
	Vice-Presidente Paulo Pinto Gontijo Filho Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 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<sup>a</sup> 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 ( $\mu\mu$ ) e micromico ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro ( $\mu\text{m}$ ;  $10^{-6}\text{m}$ ), ao invés de micro ( $\mu$ ); nanômetro (nm;  $10^{-9}\text{m}$ ), ao invés de milímicro ( $\mu\text{m}$ ); e Angstroms (A;  $10^{-10}\text{m}$ ). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ou microlitros por litro ( $\mu\text{litos/litro}$ ). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

**NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS** — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Berger's Manual of Determinative Bacteriology" (7<sup>a</sup> ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergery deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 12 Janeiro-Março 1981 Número 1

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 12 (1)

## CONTEÚDO

- |  |    |  |
|--|----|--|
| João R. dos Santos<br>& Romain R. Golgher  | 1  | Efeitos de inibidores metabólicos na multiplicação de arbovírus do grupo C                                     |
| Deise Pasetto Falcão   | 5  | Presença de <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> na América Latina              |
| Leslie C. Benchetrit<br>Lúcia M. Teixeira<br>Gedalia V.V. Borba<br>& César M. de Oliveira                        | 11 | Sensibilidade de estreptococos à cefoxitina e a outros agentes antimicrobianos                                 |
| Fernando P. Câmara<br>& Maria Amélia Cardoso   | 14 | Epidemiologia da resistência plasmidial a drogas em salmonelas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro |
| Saemi Ogassawara<br>Sérgio Benassi<br>José Luiz D'Angelino<br>Wanderley P. de Araújo<br>& Antonio Carlos Gouveia | 17 | Observações sobre <i>Trypanosoma (Megatrypanum) theileri</i> Laveran, 1902 em bovino no Estado de São Paulo    |
| Mathylde R. de Camargo<br>Murilo Graner<br>Alcides Martinelli Filho  | 22 | Qualidade microbiológica da carne bovina moída a nível de varejo e sua avaliação pela prova da resazurina      |

## CONTENTS

- |  |
|--|
| <i>Effects of metabolic inhibitors in the growth of group C. arboviruses</i>                             |
| <i>Présence de Yersinia enterocolitica et Yersinia pseudotuberculosis en Amérique Latine</i>             |
| <i>Susceptibility of streptococci to cefoxitin and to other antimicrobial agents</i>                     |
| <i>Epidemiology of drug resistance plasmids in Salmonella isolated from sewage of Rio de Janeiro</i>     |
| <i>Observations on Trypanosoma (Megatrypanum) theileri in a bovine in the state of São Paulo, Brazil</i> |
| <i>Microbiological quality of raw ground beef and its evaluation through a resazurin test</i>            |

**Sociedade Brasileira de Microbiologia**

*Sócios Patrocinadores*

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.

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

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares

## Efeito de inibidores metabólicos na multiplicação de arbovírus do grupo C

João Rodrigues dos Santos\*  
& Romain R. Golgher

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG  
Caixa Postal 2486  
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

### Resumo

Os arbovírus do grupo C — Apeu, Caraparu, Marituba, Murutucu, Nepuyo e Oriboca (família *Bunyaviridae*) — não foram inibidos na sua multiplicação em células Vero, quando estas foram tratadas com 5-bromo-desoxiuridina, 5-iodo-desoxiuridina, citosina-arabinosídeo e actinomicina D, indicando que estes vírus contém RNA como ácido nucleico.

### Summary

*Effect of metabolic inhibitors in the growth of group C arboviruses*

Group C arboviruses Apeu, Caraparu, Marituba, Murutucu, Nepuyo and Oriboca (*Bunyaviridae* family) were not inhibited in their growth in Vero cells treated with 5-bromo-deoxyuridine, 5-iodo-deoxyuridine arabinosyl-cytosine and actinomycin D, indicating that these viruses contain RNA.

### Introdução

Os arbovírus do grupo C foram isolados pela primeira vez na Amazônia (3). Posteriormente, outros vírus foram descritos e o grupo atualmente é constituído de 11 tipos. Estudos limitados sobre a morfologia e a morfogênese de alguns componentes do grupo (10) levaram à sua inclusão na família *Bunyaviridae* (5). Contudo, o conhecimento sobre as características biológicas e os dados físico-químicos sobre os vírions são escassos, pois as investigações relativas à família centraram-se especialmente nos vírus La Crosse (do serogruppo encefalite da Califórnia); Uukuniemi e o vírus da "snowshoe hare" (*Lepus americanus*) e alguns dados são conhecidos a respeito do vírus Oriboca.

Neste trabalho, procuramos explorar os efeitos de inibidores metabólicos sobre vários componentes do grupo, a fim de determinar, indiretamente, seu conteúdo em ácido nucleico e começar a exploração dos eventos intra-celulares, necessários para o seu crescimento.

### Material e Métodos

As células Vero foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) Rockville, Md, EUA e multiplicadas em meio 199 com 5% de soro inativado de carneiro; para manutenção, o percentual do soro foi de 1%.

Os vírus Apeu (BeAn 848), Caraparu (BeAn 3994), Murutucu (BeAn 974), Nepuyo (BeAn 10709) e Oriboca (BeAn 17) foram originários da ATCC; o vírus Marituba (BeAn 15) foi cedido pelo dr. Francisco de Paula Pinheiro, Belém, PA; o vírus Sindbis, pelo dr. Norman B. Finter, Beckenham, Kent, Reino Unido; o vírus herpes simples tipo 1, pelo dr. Harald zur Hausen, Freiburg, Alemanha, e o vírus vacina era derivado de uma vacina antivariólica do estado de Massachusetts, EUA. Os vírus foram multiplicados em células Vero e sua titulação foi feita pela determinação das PFU (6).

Os inibidores 5-bromo-desoxiuridina (BUDR), 5-iodo-desoxiuridina (IDU), citosina-arabinosídeo (ARA-C) e actinomicina D foram

\* Bolsista de iniciação científica do CNPq.

adquiridos da Nutritional Biochemicals (BUDR e ARA-C), Calbiochem (IDU) e Sigma Chemical Co. (actinomicina D), dissolvidos e mantidos a -20°C.

Para os experimentos com BUDR, IDU e ARA-C, as células Vero (30 mil por câmara em 0,15ml) foram distribuídas em placas de microtécnica para cultura de células (Cooke Engineering Co., Alexandria, Va., EUA). Após incubação por um dia a 37°C, o meio de crescimento foi desprezado e as células infectadas com 0,15ml de vírus. Depois da adsorção, cada câmara foi lavada para retirada do vírus não adsorvido e 0,15ml de inibidor foram acrescentados, diluídos em meio de manutenção, utilizando-se oito câmaras para cada concentração. Deixava-se o vírus multiplicar-se por 24 horas, juntava-se o sobrenadante das oito câmaras e o título resultante foi determinado. Para o material infectado com o vírus vaccínia, as células foram congeladas e descongeladas quatro vezes, o meio das oito câmaras misturado e centrifugado a 2000rpm, a 4°C, durante 10 minutos, e o sobrenadante manipulado conforme descrito acima.

Quando a actinomicina D foi usada, garrafas de 60ml com monocamadas de células Vero foram drenadas e 0,4ml de antimetabólito foram adicionados às células. Transcorridas duas horas a 37°C, a actinomicina D foi removida por lavagem e as células infectadas com 0,4ml de cada vírus. Fez-se a adsorção dos vírus por incubação a 37°C durante duas horas, lavou-se o vírus não adsorvido e deixou-se prosseguir a infecção até completar 24 horas. O sobrenadante foi colhido, mantido a -70°C e posteriormente foi determinada a sua quantidade em PFU de vírus. As células infectadas com o vírus herpes simples receberam o mesmo tratamento das células infetadas com o vírus vaccínia.

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 mostra que nenhum dos arbovírus do grupo C testados, assim como o vírus RNA controle, Sindbis, teve seu crescimento inibido pelas doses empregadas de BUDR, IDU e ARA-C. O vírus vaccínia, entretanto, teve sua multiplicação consideravelmente diminuída, para menos de 1% dos controles, em concentrações dez vezes menores dos inibidores. Alguns resultados mostraram uma possível inibição, pois os títulos dos vírus caíram para aproximadamente 50% dos controles. Saliente-se que ex-

periências realizadas em duplicata, com o mesmo material, repetidas vezes, demonstraram que o erro experimental está em cerca de 50% e, desta forma, tais achados não têm significado.

A actinomicina D (Tabela 2) diminuiu o crescimento do vírus herpes simples (vírus contendo DNA) para 0,5% do título dos controles, mas o vírus Sindbis alcançou quantidades semelhantes, com ou sem o antimetabólito. Nas mesmas concentrações, os arbovírus do grupo C não foram inibidos de modo significativo; em realidade, os vírus Marituba, Nepuyo e Oriboca tiveram seus títulos significativamente aumentados quando as células foram tratadas pela actinomicina D.

As pirimidinas halogenadas BUDR e IDU e o análogo ARA-C são inibidores da síntese de DNA (7) e são comumente empregados para se conhecer, indiretamente, a composição em ácido nucleico de um vírus, embora existam relatos esporádicos dessas substâncias, inibindo crescimento de vírus RNA (2). Pelos dados da Tabela 1, os arbovírus do grupo C utilizados deverão ser vírus RNA, conforme foi comprovado para os vírus Uukiniemi, La Crosse, e Bunyamvera, entre outros, da família *Bunyaviridae* (11).

A actinomicina D intercala-se na hélice de DNA, impedindo a síntese de RNA dependente de DNA (8) e, consequentemente, a multiplicação de vírus DNA. Seu efeito, contudo, não é específico sobre estes vírus, já que existem vírus RNA que são inibidos pelo antimetabólito, como os retrovírus (7), vírus influenza (1) e o vírus Pichinde (12). Como não houve inibição no crescimento dos arbovírus do grupo C, os resultados da Tabela 2 indicam claramente que a composição em ácido nucleico dos arbovírus estudados é RNA, corroborando os dados da tabela anterior.

Com a actinomicina D, maiores títulos de determinados arbovírus do grupo C puderam ser obtidos. Este aumento dificilmente poderia ser devido a uma inibição da produção de interferon pela célula infectada e, consequentemente maior produção de vírus, pois se estes vírus induzem interferon (9), as células Vero não podem ser induzidas a produzir tal substância (4). É possível que a inibição da síntese de RNA celular pela actinomicina D libere o maquinário celular para a síntese dos vírus, como por exemplo, o "pool" de nucleotídeos e os poliribossomos. Experimentos complementares serão necessários para se compreender a natureza deste fenômeno.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Maria Lucia Trindade e Bernadete de Jesus Martins, o apoio técnico e a Marinês Martini Teixeira, a datilografia. Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação ABIF e do CNPq (processo 222.0254/74).

**Tabela 1** — Efeito de BUDR<sup>a</sup>, IDU<sup>b</sup> e ARA-C<sup>c</sup> na multiplicação de arbovírus do grupo C

Vírus	Inibidor	Quantidade de vírus resultante	
		PFU/ml × 10 <sup>3</sup>	(% de controle)
Apeu	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	351	(78)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	295	(66)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	282	(63)
	Controle	447	(100)
Caraparu	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	570	(100)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	522	(91)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	502	(88)
	Controle	570	(100)
Marituba	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	1650	(81)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	1150	(57)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	1500	(74)
	Controle	2025	(100)
Murutucu	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	105	(105)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	87	(87)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	137	(137)
	Controle	100	(100)
Nepuyo	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	257	(76)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	170	(51)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	250	(75)
	Controle	335	(100)
Oriboca	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	82	(150)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	55	(100)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	80	(145)
	Controle	55	(100)
Vaccínia <sup>d</sup>	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	0,07	(0,08)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	0,2	(0,2)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	0,07	(0,08)
	Controle	85	(100)
Sindbis <sup>e</sup>	BUDR 10 <sup>-4</sup> M	210	(56)
	IDU 10 <sup>-5</sup> M	170	(49)
	ARA-C 10 <sup>-4</sup> M	327	(94)
	Controle	347	(100)

a — 5-bromo-desoxiuridina

b — 5-iodo-desoxiuridina

c — citosina-arabinosídeo

d — vírus DNA controle

e — vírus RNA controle

**Tabela 2 — Efeito da actinomicina D na multiplicação de arbovírus do grupo C**

Virus	Actinomicina D μg/ml	Quantidade de vírus resultante PFU/ml × 10³	(% de controle)
Apeu	10	105	(24)
	2,5	SD <sup>a</sup>	
	0	437	(100)
Caraparu	10	31	(43)
	2,5	90	(124)
	0	72	(100)
Marituba	10	45	(1384)
	2,5	30	(923)
	0	3	(100)
Murutucu	10	2	(80)
	2,5	5	(210)
	0	2,5	(100)
Nepuyo	10	165	(108)
	2,5	450	(295)
	0	152	(100)
Oriboca	10	470	(783)
	2,5	SD	
	0	60	(100)
Herpes simples <sup>b</sup>	10	0,02	(0,5)
	2,5	0,02	(0,5)
	0	5	(100)
Sindbis <sup>c</sup>	10	19250	(102)
	2,5	SD	
	0	18750	(100)

a — Sem dado na experiência mencionada

b — Vírus DNA controle

c — Vírus RNA controle

## Referências Bibliográficas

- Barry, R.D.; Ives, D.R. & Cruickshank, J.G. — Participation of deoxyribonucleic acid in the multiplication of influenza virus. *Nature*, 194:1139-1140, 1962.
- Campbell, J.B.; Maes, R.F.; Wiktor, T.J. & Koprowski, H. — The inhibition of rabies virus by arabinosyl cytosine: studies on the mechanism and specificity of action. *Virology*, 34:701-708, 1968.
- Causey, O.R.; Causey, C.E.; Maroja, O.M. & Macedo, D.G. — The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto underscribed serological groups in the amazon region of Brazil. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 10:227-249, 1961.
- Desmyter, J.; Melnick, J.L. & Rawls, W.E. — Defectiveness of interferon production and of rubella interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J. Virol.*, 2:955-961, 1968.
- Fenner, F. — International Committee on Taxonomy of Viruses: official names for viral families. *J. Gen. Virol.*, 26:215, 1975.
- Ferreira, P.C.P.; Petrillo-Peixoto, M.L.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. — Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J. Clin. Microbiol.*, 9:471-475, 1979.
- Luria, S.E.; Darnell Jr., J.E.; Baltimore, D. & Campbell, A. — General virology. 3rd. ed. New York, John Wiley, 1978.
- Mahler H.R. & Cordes, E.H. — Biological chemistry. 2nd. ed. New York, Harper and Row, 1971.
- Mezencio, J.M.S.; Petrillo-Peixoto, M.L.; Ferreira, P.C.P. & Golgher, R.R. — Induction of interferon by group C arboviruses. *Arch. Virol.*, 58:335-356, 1978.
- Murphy, F.A.; Harrison, A.K. & Whitfield, S.G. — *Bunyaviridae*: morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamvera serologic super group viruses and several other arthropod-borne viruses. *Intervirology*, 1:297-316, 1973.
- Obijeski, J.F. & Murphy, F.A. — *Bunyaviridae*: recent biochemical developments. *J. Gen. Virol.*, 37:1-14, 1977.
- Rawls, W.E.; Banerjee, S.N.; McMillan, C.A. & Buchmeier, M.J. — Inhibition of Pichinde virus replication by actinomycin D. *J. Gen. Virol.*, 33:421-434, 1976.

## Présence de *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis* en Amérique Latine\*

Deise Pasetto Falcão

Faculdade de Ciências Farmacêuticas,  
Campus de Araraquara, UNESP,  
14.800 Araraquara SP., Brésil

### Resumo

Ce travail constitue le bilan des connaissances actuelles sur la présence de *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis* dans l'Amérique Latine. Il comporte une revue exhaustive de la littérature et l'étude détaillée de 102 souches de *Yersinia*, provenant du Brésil, du Chili, du Pérou, d'Argentine, d'Uruguay et du Guatemala.

### Summary

This paper represents a summary of what was made until now about the presence of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Latin America. It was realized an exhaustive review of the literature and a full study of 102 strains of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* isolated in Brazil, Chile, Peru, Argentin, Uruguay and Guatemala.

### Resumo

Presença de *Yersinia enterocolitica* e *Yersinia pseudotuberculosis* na América Latina

Este trabalho se constitui num resumo de que se conhece, no momento, sobre a presença de *Yersinia enterocolitica* e de *Yersinia pseudotuberculosis* na América Latina. Foi realizada uma revisão pormenorizada da literatura e foram estudadas detalhadamente 102 amostras.

### Introduction

*Yersinia pseudotuberculosis* et, depuis une date plus récent, *Yersinia enterocolitica*, sont retrouvées chez les animaux, chez l'homme et dans le milieu extérieur. Chez l'homme, certains aspects cliniques sont communs aux deux étiologies: septicémie, adénite mésentérique, érythème noueux. Si *Y. pseudotuberculosis* entraîne surtout des adénites mésentériques (fausse appendicite) chez l'enfant, *Y. enterocolitica* entraîne le plus souvent, surtout chez les jeunes enfants, une entérite, mais peut également entraîner des polyarthrites chez les adultes.

*Y. pseudotuberculosis* est surtout présent en Europe occidentale et centrale et n'a été qu'exceptionnellement isolée en Afrique et dans le continent américain. Il est plus difficile d'apprécier la répartition de *Y. enterocolitica* car l'isolement de cette bactérie est encore fonction de son degré de connaissance et de recherche systématique.

En contraste avec le grand nombre d'isollements de ces microorganismes en Europe et dans l'Amérique du Nord, plus rares sont les cas dans l'Amérique Latine. Entre 1968 et Juillet de 1980, 3 souches de *Y. pseudotuberculosis* et 102 souches de *Y. enterocolitica* provenant de différents pays d'Amérique Latine ont

---

\* Travail réalisé dans le laboratoire de l'Unité d'Ecologie Bactérienne, Centre International de Référence des *Yersinia*, Institut Pasteur, Paris, France, avec une bourse de perfectionnement du CAPES.

été reçues et confirmées au Centre Collaborateur de l'Organisation Mondiale de la Santé pour le *Yersinia*\* et au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie, Araraquara, São Paulo, Brésil.

Il a été fait également une enquête épidémiologique sur des sérum humains, au Brésil (17). Nous dirons seulement ici que sur 1069 sérum humains, nous avons trouvé environ 1% de positifs pour *Y. enterocolitica* (sérogroupes 03 et 09) et rien pour *Y. pseudotuberculosis* (0I e 0II).

A partir des souches étudiées dans ces deux laboratoires et d'après revue de la littérature, nous essayons d'établir ici le bilan de la présence de *Y. enterocolitica* et de *Y. pseudotuberculosis* dans l'Amérique Latine.

### Materiel et Methodes

*Souches bactériennes* — La liste des 102 souches de *Y. enterocolitica* qui ont été étudiées figure dans le Tableau 1.

De les trois souches de *Y. pseudotuberculosis*, deux ont été isolées en Argentine, (l'une à partir de selles d'un enfant, l'autre d'un cobaye) e la troisième en Brésil (à partir de selles de porc).

*Méthodologie* — La caractérisation de *Y. enterocolitica* a été faite en chimiotypes, sérotypes et lysotypes. La détermination du chimotype a été faite en utilisant le système API (API 20 et API 50) et les épreuves biochimiques recommandées par Wauters (33). Pour la sérotypie, les 34 sérum O anti-*Y. enterocolitica* furent utilisés (35, 36) et, pour la lysotypie, la technique et les phages recommandés par Nicolle & col. (21).

La caractérisation de *Y. pseudotuberculosis* a été faite par les épreuves biochimiques du système API 20 et par la détermination du séro-groupe selon le schéma antigénique proposé par Thal & Knapp (29).

### Résultats et Discussion

Le premier isolement de *Y. pseudotuberculosis* en Amérique Latine a été publié en 1928 en

Argentine par Sautu Riestra (26) qui a décrit une enzootie ayant détruit tous les cobayes d'une animalerie universitaire. En Argentine encore, en 1934, Quevedo (25), inoculant à un cobaye une suspension contenant des fragments de foetus de bovin avarié, en vue d'isoler *Bacillus abortus*, provoqua la mort de l'animal; les lésions du foie et de la rate évoquaient la pseudotuberculose et permirent d'isoler *Yersinia pseudotuberculosis*. En 1961 Colusi (3), a décrit une épizootie streptococcique chez le cobaye avec également isolement de souches de *Y. pseudotuberculosis*. Plus récemment Furowicz & col., en dépit de recherches systématiques, n'ont pas réussi à isoler *Y. enterocolitica* ni *Y. pseudotuberculosis* à partir des organes de divers animaux. Ils ont d'abordensemencé le foie et la rate de 72 animaux (veau, vache, brebis, porc, poule, loutre et lapin) (12). Dans un autre travail, ils ont fait la même recherche chez 312 autres animaux (11). Cependant le même groupe de chercheurs a décrit, plus tard, une petite épidémie familiale due à *Y. pseudotuberculosis*, en relation avec un cobaye (9, 10).

En Uruguay, Monteverde & col., en 1954, ont isolé cet organisme d'une adénite sous-maxillaire d'une jument (19). Echenique & Sosa de Caruso ont rapporté, en 1959, l'isolement d'une souche de *Y. pseudotuberculosis* d'un foie de souris (4), mais les caractères biochimiques de cette souche laissent quelques doutes sur son identification.

Au Brésil, Hofer & col. ont isolé en 1979, *Y. pseudotuberculosis* du contenu intestinal d'un rongeur sauvage apparemment sain (16) tandis que Barcellos l'a isolée à partir des selles de porcs atteints de diarrhée (données non publiées).

*Y. enterocolitica* a été isolée pour la première fois au Brésil en 1968 par Giorgi & col., à partir d'abcès hépatique de six singes morts au Jardin Zoologique de São Paulo (15, 18). Tous les six animaux moururent presque subitement après quelques mois de captivité. L'année suivante, les mêmes chercheurs rapportèrent un isolement à partir de selles de porcs (18) et, en 1974 (27), puis en 1979\*\* deux autres isolements à partir de primates en captivité au Zoo de São Paulo; le premier mourut après 12 mois de captivité et *Y. enterocolitica* fut isolée de la rate et du foie; le deuxième présenta subitement un ta-

\* Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, F. 75015 Paris (dir. Professeur H.H. Mollaret).

\*\* Genovez, M.E.; Giorgi, W. & Simon, F. — Novo isolamento de *Yersinia enterocolitica* de sagui (*Callithrix penicillata*). O Biológico, (à paraître)

bleau clinique encéphalitique mortel: l'isolation fut obtenu à partir de la rate et du foie.

Toujours à partir d'animaux, *Y. enterocolitica* fut isolée au Brésil, de selles de rongeurs apparemment sains, par Decarlis & Seabra en 1970\*\*\* et par Hofer & col. en 1979 (16); de selles de porcs sains par Decarlis & Seabra en 1979\*\*\* et de selles de chiens sains ou malades, par Paiva & Ricciardi (données non publiées). Barcellos, pendant 1979 et 1980, en Rio Grande do Sul, après avoir étudié 239 échantillons de selles de porcs atteints de diarrhée, a isolé 21 souches de *Yersinia enterocolitica* (données non publiées).

Au Chili, en 1977, Alonso & Zamorra ont étudié les organes de 291 rongeurs sauvages et ont isolé des souches de *Y. enterocolitica* de 9 d'entre eux (1). Encore au Chili, Zamorra & col., en 1979, ont recherché *Y. enterocolitica* chez 305 souris sauvages et ont trouvé 12 animaux porteurs (37); Munoz l'a recherchée dans le contenu caecal de 100 bovins (20) et a réussi à l'isolér à partir de trois animaux.

La description du premier isolement de *Y. enterocolitica* à partir de matériel humain a été faite en 1976 à Araraquara (São Paulo), par Pizsolitto & col., dans un cas de pseudo-appendicite (23). D'autres souches de *Y. enterocolitica* ont ensuite été isolées de l'homme au Brésil et dans d'autres pays. A São Paulo l'organisme a été isolé de selles de sujets sains (8), de sécrétions oropharyngées (30) et de fèces diarrhéiques de deux enfants\*\*\*\*. Decarlis & col. à Botucatu (São Paulo) l'ont isolé aussi de selles d'enfants avec gastroentérite\*\*\*\*\*. Stumpf & col. (28), Fontes & col. (7), Ferreira & col. (6) et Nunes & Ricciardi (données non publiées), tous à Rio de Janeiro, l'ont isolé d'enfants atteints de diarrhée. Prado & Conhen, au Chili, après avoir recherché *Y. enterocolitica* dans les selles de 100 enfants de moins de deux ans, atteints de diarrhée aigüe, l'ont isolée dans un cas (24), en 1979; toujours au Chili, *Y. enterocolitica* fut isolée par Garcia & col. (13) en 1978 de l'appendice d'une personne évoquant un diagnostic d'appendicite aigüe. Guevara & col., au Pérou, ont isolé 7 souches de *Y. enterocolitica* de selles d'enfants atteints de gastroentérite, pendant la période

d'avril 1978 à mars 1979\*\*\*\*\*. Gini & Torres, en 1979 au Guatemala, ont isolé deux souches de *Y. enterocolitica* de selles d'enfants atteints de diarrhée (14).

Les uniques isolements à partir d'aliments ont été faits par Tibana & Ricciardi, à Rio de Janeiro, à partir du lait, en 1980 (données non publiées).

Alonso, au Chili, en 1980, a isolé 3 souches de *Y. enterocolitica* d'eau de rivière qui constituent les uniques souches isolées à partir de l'environnement en Amérique du Sud (données non publiées).

L'analyse du Tableau 1 montre que la majorité des souches que nous avons étudiées ont été isolées à partir de l'homme et du porc, en proportion presque égale.

Au point de vue clinique, la plupart des souches ont été isolées d'enfants souffrant de gastroentérite; une seule souche provenait d'un cas de pseudo-appendicite et quelques autres de porteurs sains. La bactérie n'a pas été isolée dans d'autres formes cliniques; toutes les souches ont été isolées à partir des selles à l'exception d'une provenant de sécrétion oropharyngée, prélevée pour étude de la flore pharyngée après antibiothérapie.

Tous les rongeurs étaient des porteurs sains. Par contre la bactérie a entraîné la mort chez tous les primates chez qui elle a été retrouvée.

Le grand nombre d'isolements de *Y. enterocolitica* à partir de porcs indique qu'au Brésil aussi ces animaux sont fréquemment infectés, comme cela a été observé dans d'autres pays (5, 22, 31, 32, 34).

La quasi non existence d'isolement de *Y. enterocolitica* à partir d'aliments et de l'environnement est très probablement le résultat d'un manque d'enquêtes systématiques.

Le Tableau 2 résume les isolements faits dans l'Amérique Latine à ce jour, incluant les souches étudiées par nous-même et celles figurant dans la littérature. La plupart de ces souches ont été isolées au Brésil.

Le Tableau 3 montre les propriétés biochimiques, sérotypiques et lysotypiques des souches de *Y. enterocolitica*: un numéro large (36, 27%) sont du chimiotype 4, du sérogroupe 03 et du

\*\*\* Decarlis, M.R.S.T. & Seabra, E. — *Y. enterocolitica* isolada a partir de animais selvagens e domésticos em Botucatu, S.P. (à paraître).

\*\*\*\* Baldacci, E.R.; Grisi, S.E. & Trabulsi, L.R. — *Yersinia enterocolitica* como causa de diarreia aguda em lactente: a respeito de dois casos. (à paraître).

\*\*\*\*\* Decarlis, M.R.S.T., Falcão D.P., Maffei, H.V. & Pavan, C. — *Yersinia enterocolitica* isolada de criança com diarreia crônica, em Botucatu, S.P. (à paraître).

\*\*\*\*\* Guevara, J.M.; Chumpitaz, J.; Vergara, J.; Anaya, R.; Terreros, A. & Requena, A. — Primeros aislamientos de *Yersinia enterocolitica* en el Peru (à paraître).

Tableau 1 — Origine des 102 souches de *Y. enterocolitica* étudiées

Origine	Nombre de souches	Nature des prélèvements	Pathologie	Nombre de cas
Homme	1	secrétion pharyngée	porteur sain	(1)
	21	selles	pseudoappendicite gastroentérite porteur sain	(1) (19) (1)
Porc	23	selles	diarrhée porteur sain	(21) (2)
Rongeur	1	rate		
	2	foie	porteur sain	(7)
	4	selles		
Singe	2	foie et rate	abcès foie et rate	(2)
	4	foie	abcès foie	(4)
Chien	34	selles	diarrhée porteur sain	(?) (?)
Bovin	3	contenu caecal	porteur sain	(3)
Aliment	4	lait cru		(4)
Environnement	3	eau de rivière		(3)

Tableau 2 — Pays latino-américains chez lesquels *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* ont été isolées

Pays	Nombre de cas		Année du 1 <sup>er</sup> isolement	
	<i>Y. enterocolitica</i> *      **	<i>Y. pseudotuberculosis</i> *      **	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Brésil	80	4(16,18) <sup>a</sup>	1	1968
Chili	13	16(1,37) <sup>a</sup>	—	1979
Perou	7	—	—	—
Argentine	—	—	2 ?(3,25,26) <sup>a</sup>	1928
Uruguay	—	—	—	1954
Guatemala	2	—	—	—

\* étudiés par nous

\*\* d'après la revue de la littérature

a = référence bibliographique

lysotype VIII, biotype qui cause chez l'homme le syndrome intestinal classique et qui est également isolé le plus fréquemment chez les porcs (5, 22, 31, 32, 34). Parmi les 42 souches de ce type, 23 provenaient de porcs, 10 de l'homme, 6 de singes, 2 de chiens et 1 de rongeur.

Nous pouvons également observer, sous réserve du petit nombre des isolements, (Tableau 3) que les souches isolées en différentes régions de l'Amérique Latine appartiennent à des types différents: tandis qu'au Brésil et au Pérou il y a prédominance des souches du chimiotype 4, sérotype 03 et lysotype VIII isolées tant chez l'homme que chez les animaux, au Chili prédominent les souches du chimiotype 1, du sérogroupe 0:7,8 et du lysotype X<sub>z</sub> isolées chez les animaux.

Un fait apparaît intéressant: c'est le pourcentage relativement élevé (28,43%) dans lequel se retrouvent les souches isolées de selles de

chien et appartenant au chimiotype 1, au sérotype 05 et au lysotype X<sub>z</sub>.

Sept souches ne correspondaient pas aux biotypes proposés par Wauters (33); quatre ont été identifiées comme *Y. intermedia*, deux comme *Y. frederiksenii*, selon la nomenclature proposée par Brenner (2) et Brenner & col. (données non publiées) après étude des caractères biochimiques et de l'homologie génétique, et deux sont des *Yersinia* inclassables.

En ce qui concerne les souches de *Y. pseudotuberculosis*, deux appartiennent au sérogroupe OI, et une au sérogroupe OIII.

### Remerciements

Nous remercions Madame Annie Guiyoule pour son assistance technique (Institut Pasteur, Paris).

Tableau 3 — Caractères des 102 souches de *Y. enterocolitica* ou apparentées étudiées

Caractérisation	Chimiotype	Serotype	Lysotype	Nbre de souches **    ***	Pays	Origine	Isolées par
	4	0:3	VIII	37/80	Brésil	{ Homme Singe Rongeur Porc Chien Homme	Pizsolitto & col. (23) <sup>a</sup> Fontes & col. (8) <sup>a</sup> Decarlis & col. (*) Baldacci & col. (*) Paiva & Ricciardi (*) Giorgi & col. (15) <sup>a</sup> Simon & col. (27) <sup>a</sup> Genovez & col. (*) Decarlis & Seabra (*) Decarlis & Seabra (*) Barcellos & col. (*) Paiva & Ricciardi (*) Guevara & col. (*)
	2	0:5	X <sub>z</sub>	5/7	Pérou	Homme	Stumpf & col. (28) <sup>a</sup>
	1	0:5	X <sub>z</sub>	30/80	Brésil	Homme Chien	Toledo & Falcão (30) <sup>a</sup> Paiva & Ricciardi (*)
	1	0:6,31	X <sub>z</sub>	1/80	Brésil	Chien	Paiva & Ricciardi (*)
	<i>Y. intermedia</i>	0:7,8	X <sub>o</sub>	3/80	Brésil	Lait cru	Tibana & Ricciardi (*)
	<i>Y. frederiksenii</i>	0:16	X <sub>z</sub>	1/80	Brésil	Lait cru	Tibana & Ricciardi (*)
	<i>Y. intermedia</i>	0:17	X <sub>o</sub>	1/80	Brésil	Chien	Paiva & Ricciardi (*)
	<i>Y. intermedia</i>	NAG	X <sub>z</sub>	1/80	Brésil	Homme	Paiva & Ricciardi (*)
	<i>Y. frederiksenii</i>	0:16	X <sub>o</sub>	1/80	Brésil	Chien	Paiva & Ricciardi (*)
	2	0:9	VIII	2/7	Pérou	Homme	Guevara & col. (*)
	1	0:7,8	X <sub>z</sub>	6/13	Chili	Rongeur Bovin	Alonso & col. (1) <sup>a</sup> Zamora & col. (37) <sup>a</sup> Munoz (20) <sup>a</sup>
	1	0:4,32	X <sub>z</sub>	3/13	Chili	Rongeur	Alonso & col. (1) <sup>a</sup> Zamora & col. (37) <sup>a</sup>
	1	0:7,8	VIII	1/13	Chili	Homme	Prado & Cohen (24) <sup>a</sup>
	<i>Y. intermedia</i>	0:7,8	X <sub>z</sub>	1/13	Chili	Eau	Alonso (*)
	<i>Y. inclassable</i>	NAG :	X <sub>z</sub>	2/13	Chili	Eau	Alonso (*)
	3	0:1,2a,3	II	1/2	Guatemala	Homme	Gini & col. (14) <sup>a</sup>
	3	0:1,2a,3	XI	1/2	Guatemala	Homme	Gini & col. (14) <sup>a</sup>

NAG = non agglutinables

a = référence bibliographique  
(\*) = donnés non publiés  
(\*\*) = étudiées par nous  
(\*\*\*) = isolées dans chaque pays

## Bibliographie

1. Alonso, O. & Zamora, J. — Estudio bacteriológico en ratones silvestres. I — Aislamiento de *Yersinia enterocolitica*. Resumen Publ. Soc. Biol. (Chile), 20:R-119, 1977.
2. Brenner, D.J. — Speciation in *Yersinia*. Contr. Microbiol. Immunol., 5:33-43. Karger, Basel, 1979.
3. Colusi, A.D. — Enzootia de cobayos debida a estreptococcus zoopidermicus var. rodentium. I — Presencia de pseudotuberculosis en un porcentaje de animales muertos de septicemia estreptococcica. In: — II Congreso Nacional de Veterinaria, Buenos Aires, Noviembre, 6-11, 1960. vol. 774, 1961.
4. Echenique, L. & Sosa de Caruso, N. — Seudotuberculosis a Pasteurela seudotuberculosis. Ann. Facul. Veter. Uruguay, 8:55-67, 1959.
5. Esseveld, H. & Goudzwaard, C. — On the epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections: pigs as the source of infections in man. In: — Intern. Symp. on *Yersinia, Pasteurella and Francisella*, Malmö, Apr. 10-12, 1972. Proceedings. Karger Basel, p. 93-101, 1973.
6. Ferreira, M.C.S.; Otto, S.S.; Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. — Isolamento de *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica* associados a diarréias infantis no Rio de Janeiro.

- ro. In: — Programa-Resumos X Cong. Brasil. Microbiol., Rio de Janeiro, Julho 23-27, p. 62, 1979.
7. Fontes, C.F.; Ferreira, M.C.S.; Nunes, M.P.; Otto, S.S.; Couto, M.M.; Martins, M.R. & Ricciardi, I.D. — Pesquisa de agentes bacterianos associados à diarréia infantil no Rio de Janeiro. In: — Programa Resumos X Cong. Brasil. Microbiol., Rio de Janeiro, Julho 23-27, p. 61, 1979.
  8. Fontes, C.F.; Toledo, M.R.F.; Reis, M.H.L.; Mura-hovschii, J. & Trabulsi, L.R. — Isolamento de uma amostra de *Yersinia enterocolitica* das fezes de uma criança na cidade de São Paulo. Rev. Microbiol. (São Paulo), 9:167-168, 1978.
  9. Furowicz, A.J.; Bagnat, E.; Terzolo, H.R.; Grenovich, H.; Pessaco, A.; Pereira, J.J.; Zamora, A.S. & Zoratti de Verona, A. — Primer aislamiento en la Argentina de *Yersinia pseudotuberculosis* (bacilo de Malassez y Vignal) de un cobayo (*Cavia porcellus*) y de materia fecal humana. Medicina (Buenos Aires), 38:45-52, 1978.
  10. Furowicz, A.J.; Bagnat, E.; Terzolo, H.R.; Grenovich, H. & Pereira, J.J. — Une épidémie familiale à *Yersinia pseudotuberculosis*: premier isolement de ce germe en République Argentine. Med. Mal. inf., 7:426-427, 1977.
  11. Furowicz, A.J.; Pereira, J.J. & Terzolo, H.R. — Investigaciones sobre la incidencia de las bacterias *Yersinia Rodentium* (bacile de Malassez y Vignal) e *Yersinia enterocolitica* (*Pasteurella X*) en los animales. Rev. Med. Vet. (Buenos Aires), 58:325-335, 1977.
  12. Furowicz, A.; Zamora, A. & Terzolo, H. — Primeros estudios e investigaciones de la actuacion de las bacterias *Yersinia rodentium* (*Pseudotuberculosis*) y *Yersinia enterocolitica* en los animales. Gac. Vet., 37:307-314, 1975.
  13. Garcia, J.M.; Maldonado, A.B. & Lobos, T. — Primer aislamiento de *Yersinia enterocolitica* en intestino humano adulto en Chile. Bol. Inst. Bacter. Chile, 20:42-45, 1978.
  14. Gini, G.A. & Torres, M.F. — Primeros aislamientos de *Yersinia enterocolitica* en Centro America y revision de la literatura. Rev. Lat-amer. Microbiol., 21:107-113, 1979.
  15. Giorgi, W.; Matera, A.; Mollaret, H.H. & Pestana de Castro, A.F. — Isolamento de *Yersinia enterocolitica* de abcessos hepáticos de saguis (*Callithrix penicillata* e *Callithrix jacchus*). Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 36:123-127, 1969.
  16. Hofer, E.; Fernandes, M.F.T.; Veiga, T.; Oliveira, M.S. & Abraham, A.T. — Isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica* de roedores capturados no município de Friburgo R.J. In: — Programa-Resumos X Cong. Brasil. Microbiol., Rio de Janeiro, Julho 23-27, p. 62, 1979.
  17. Lopes, M.A. & Falcão, D.P. — Aglutininas anti *Yersinia enterocolitica* e anti *Yersinia pseudotuberculosis* em soros humanos, Rev. Microbiol. (São Paulo), 11:34-40, 1980;
  18. Mollaret, H.H.; Giorgi, W.; Matera, A.; Pestana de Castro, A.F. & Guillon, J.C. — Isolement de *Yersinia enterocolitica* chez le singe callitriché au Brésil. Rec. Med. Vet., 146:919-924, 1970.
  19. Monteverde, J.J. & Roldan Bonadeo, N. — Aislamiento de *Pasteurella pseudotuberculosis* en una adenopatía supurada del equino. Anais do II Cong. Panamer. Med. Vet., 2, São Paulo, Abril 3-10, p. 189, 1954.
  20. Munoz, A. — Investigacion de *Yersinia enterocolitica* en bovinos. Universidad Astral de Chile, 1980. (Thèse).
  21. Nicolle, P.; Mollaret, H.H. & Brault, J. — Nouveaux résultats sur la lysotypie de *Yersinia enterocolitica* portant sur plus de 4.000 souches d'origines diverses. Rev. Epidem. Santé Publ., 24:479-496, 1976.
  22. Pedersen, K.B. — Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in the throat of swine. Contr. Microbiol. Immunol., 5:253-256, 1979.
  23. Pizsolitto, A.C.; Falcão, D.P.; Shimizu, M.T.; Galvão, S.H.M. & Giraldini, W. — The first isolation of human *Yersinia enterocolitica* in Brazil: case report. Contr. Microbiol. Immunol., 5:169-173, 1979.
  24. Prado, V.J. & Cohen, V.J. — *Yersinia enterocolitica*: su rol como agente de diarrea aguda en lactantes chilenos. Rev. Chil. Ped., 51:69-72, 1980.
  25. Quevedo, J.M. — Sobre un germe que provoca lesiones de pseudotuberculosis. Bol. Min. Agr. Nac., 36:99-110, 1934.
  26. Sautu Riestra, M.R. — Sobre una seudo tuberculosis del cobayo, Rev. Fac. Med. Vet. (La Plata), 3:489-503, 1930.
  27. Simon, F.; Giorgi, W.; Mollaret, H.H. & Matera, E.A. — Über eine *Yersinia enterocolitica* infektion bei einem springaffchen (*Callicebus moloch hofmanni*), Verhdl. XVII Int. Symp. Erkrank. Zoot., Tunis 1975, Berlin, Akademie Verlag, 303-305, 1975.
  28. Stumpf, M.; Ricciardi, I.D.; Oliveira, M.; Salna, A. & Bernholft, M. — *Yersinia enterocolitica* as a cause of infantile diarrhoeae in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Bras. Pesq. Med. Biol., 11:383-384, 1978.
  29. Thal, E. & Knapp, W. — A revised antigenic scheme of *Yersinia enterocolitica*. In: — Int. Symp. Enterobacterial Vaccines: Proceed. Symp. Series Immunol. Stand., 15, 1971.
  30. Toledo, M.R.F. & Falcão, D.P. — *Yersinia enterocolitica* fermentadora rápida de lactose: isolamento a partir de material de garganta. Rev. Microbiol. (São Paulo), 11:136-137, 1980.
  31. Toma, S. & Deidrick, V.R. — Isolation of *Yersinia enterocolitica* from swine. J. Clin. Microbiol., 2:478-481, 1975.
  32. Tsubokura, M.; Otsuki, K. & Itagaki, K. — Studies on *Yersinia enterocolitica*. I — Isolation of *Y. enterocolitica* from swine. Jap. J. Vet. Sc., 35:419-424, 1973.
  33. Wauters, G. — Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Université Catholique de Louvain, 1970. (Thèse d'agregation).
  34. Wauters, G. — Carriage of *Yersinia enterocolitica* serotype 3 by pigs as a source of human infection. Contr. Microbiol. Immunol., 5:249-252, 1979.
  35. Wauters, G.; Le Minor, L. & Chalon, A.M. — Antigènes somatiques et flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. Ann. Inst. Pasteur, 120:631-642, 1971.
  36. Wauters, G.; Le Minor, L.; Chalon, A.M. & Lassen, J. — Supplément au schéma antigénique de *Yersinia enterocolitica*. Ann. Inst. Pasteur, 122:951-956, 1972.
  37. Zamora, J.; Alonso, O. & Chahuan, E. — Isolement et caractérisation de *Yersinia enterocolitica* chez les rongeurs sauvages du Chili. Zbl. Vet. Med. B., 26:392-396, 1979.

## Susceptibility of streptococci to cefoxitin and to other antimicrobial agents\*

Leslie C. Benchetrit

Lúcia M. Teixeira

Gedalia V.V. Borba

& César M. de Oliveira

*Instituto de Microbiologia UFRJ, Caixa Postal 68040  
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

### Summary

The susceptibility of 175 streptococcal clinical isolates to cefoxitin and to major antimicrobial agents was examined. With no exception, all isolates were sensitive to these antibiotics. No unusual antibiotic-resistance pattern was detected.

### Resumo

*Sensibilidade de estreptococos à cefoxitina e a outros agentes antimicrobianos*

Foi examinada a sensibilidade de 175 amostras de estreptococos, isoladas de material clínico, à cefoxitina e a outros agente antimicrobianos mais usados. Sem exceção, todos microorganismos isolados foram sensíveis a estas drogas, não sendo observado qualquer padrão raro de resistência.

### Introduction

Bacteriophages have an important role in the mechanism of genetic exchange among group A streptococci and may influence decisive biological properties such as antibiotic-resistance (12, 16) and virulence (4, 13). Since the original observation by Leonard & col. in 1968 of streptomycin-transduction by bacteriophages in group A streptococci (10) there has been detected or observed transduction of resistance to antibiotics in both directions between group A and group C streptococci and from group A to group G streptococci (5, 16). The occurrence of erythromycin and lincomycin resistance of group A streptococci has been documented in different countries with temperate climates (6, 7).

While studying the role of temperate streptococcal bacteriophages in the prevalence of strains of group A streptococci among human

populations, a screening for drug resistance was performed in recently isolated strains of group A streptococci. In addition, isolates of groups B, C and G streptococci were examined. A new broad-spectrum bactericidal antibiotic, cefoxitin, was tested against the clinical isolates.

### Material and Methods

**Strains** — Strains of beta-hemolytic streptococci were collected from September 1978 until October 1979 from patients with streptococcal infection or complications, in Rio de Janeiro. Specimens were from the throat, nose and skin lesions (3). Methods for isolation and classification into Lancefield groups have been described elsewhere (3).

\* Trabalho realizado com auxílio financeiro do CNPq (Processo n° 2222.1749/78) e FINEP (Convênio 527/CT).

**Media** — Broth and blood agar plates for bacterial growth have been described (3). Plating medium for susceptibility tests consisted of Mueller-Hinton agar with 5% sheep blood.

**Susceptibility tests** — Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disk diffusion method (2). Cefoxitin was from Merck, Sharp & Dohme do Brasil. All other antibiotics used throughout the study were from Difco Laboratories.

## Results

Of the 175 isolates of streptococci, 121 were group A, 13 group B, 2 group C and 38 group G. Table 1 summarizes the results of susceptibility tests with these isolates. None of the 175 strains was resistant to ampicillin, carbenicillin, cephalothin, chloramphenicol, erythromycin, lincomycin, penicillin and the new antibiotic, cefoxitin. As anticipated, all of the 175 strains were resistant to colistin and nalidixic acid. Susceptibility to sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT) was detected in 1.7% of group A, 1.8% of group B and 50% of group G strains. Resistance to gentamicin was detected in 51% of group A, 92.3% of group B and 8.1% of group G strains. One group C strain was resistant to gentamicin and the other one to SXT. Three group A and 1 group G strains were sus-

ceptible to kanamycin and neomycin. With regard to tetracycline, 25.6% of group A, 7.7% of group B, 26.3% of group G and the 2 group C strains were sensitive to this antibiotic.

Eighty six strains of group A, 10 of group B, 35 of group G and the 2 group C were tested against novobiocin, vancomycin and sisomicin. None of these strains presented resistance to either antibiotic.

## Discussion

The frequency of appearance of antibiotic-resistance among beta-hemolytic streptococci has increased in recent years. In group A streptococci, prevalence of tetracycline-resistance of up to 44% has been reported (8). The prevalence of erythromycin, lincomycin and chloramphenicol resistance has increased in incidence up to 2% but remained that low in most countries (6, 9, 14, 15). Resistance to tetracycline has been found in up to 85% of group B streptococci (1) and resistance of this organism to chloramphenicol, lincomycin and erythromycin has been reported (8). As yet all group A, B, C and G streptococci have been found to be sensitive to penicillin. Susceptibility of group A streptococci to erythromycin and lincomycin however is no longer assumed and routine testing of streptococcal isolates by the agar-diffusion method is now recommended (7).

**Table 1** — Susceptibility of 175 strains of beta-hemolytic streptococci to cefoxitin and 13 other antimicrobial agents

Antimicrobial agent	Concentration ( $\mu\text{g}$ )	Serological group			
		A	B	C	G
Ampicillin	10	100*	100	100	100
Carbenicillin	50	100	100	100	100
Cephalothin	30	100	100	100	100
Chloramphenicol	30	100	100	100	100
Colistin	10	0	0	0	0
Erythromycin	15	100	100	100	100
Gentamicin	10	49	7.7	50	91.9
Kanamycin	30	2.5	0	0	2.6
Lincomycin	2	100	100	100	100
Nalidixic acid	30	0	0	0	0
Neomycin	30	2.5	0	0	2.6
Penicillin G	10 units	100	100	100	100
Sulfamethoxazole/ Trimethoprim	23.75/ 1.25				
Tetracycline	30	25.6	7.7	100	26.3
Cefoxitin	30	100	100	100	100

\* Percentage of isolates susceptible.

In the present study, all of the 175 isolates were susceptible to erythromycin and lincomycin. The 175 strains were uniformly susceptible to penicillin G, ampicillin and cephalothin. No unusual pattern of antibiotic resistance was detected. Susceptibility of clinical isolates of streptococci to commonly used antibiotics should however continue to be monitored closely in the future.

Work, is in progress to determine the degrees of erythromycin and lincomycin-resistance of group A streptococci.

### Acknowledgments

We thank Merck, Sharp & Dohme do Brasil for the gift of cefoxitin disks.

### References

1. Anthony, B.T. & Conception, N.T. — Group B streptococcus in a general hospital. *J. Infect. Dis.*, 132:561-567, 1975.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
3. Benchetrit, L.C.; Borges Neto, A.A.; Figueiredo, A.M.S. & Oliveira, C.M. de — Occurrence of group A and nongroup A beta-hemolytic streptococci in human infections in Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.*, 11:50-54, 1980.
4. Cleary, P.P. & Johnson, Z. — Possible dual function of M protein: resistance to bacteriophage A25 and resistance to phagocytosis by human leukocytes. *Infect. Immun.*, 16:280-292, 1977.
5. Colon, A.E.; Cole, R.M. & Leonard, C.G. — Intergroup lysis and transduction by streptococcal bacteriophages. *J. Virol.*, 9:551-553, 1972.
6. Dixon, J.M.S. — Group A streptococcus resistant to erythromycin and lincomycin. *Can. Med. Assoc. J.*, 99:1093-1094, 1968.
7. Dixon, J.M.S. & Lipinski, A.E. — Prevalence of antibiotic resistance in pneumococci and group A streptococci, p. 272-273. In: — Parker, M.T., ed. — Pathogenic streptococci. Reedbooks, Chertsey, 1979.
8. Engel, H.W.B.; Van Embden, J.D.A.; Van Klinger, B. & Soedirman, N. — Transferable drug resistance in group A, B and D streptococci, p. 282-283. In: — Parker, M.T., ed. — Pathogenic streptococci. Reedbooks, Chertsey, 1979.
9. Kohn, J.; Hewitt, J.H. & Fraser, C.A.M. — Group A streptococcus resistant to lincomycin. *Br. Med. J.*, 1:703, 1968.
10. Leonard, C.G., Colon, A.E. & Cole, R.M. — Transduction in group A streptococcus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 30:130-135, 1968.
11. Malke, M. — Transduction of group A streptococci, p. 119-133. In: — Wannamaker, L.W. & Matsen, J.M., eds. — Streptococci and streptococcal diseases: recognition, understanding and management. New York, Academic Press, 1972.
12. Malke, H.; Starke, R.; Köhler, W.; Kolesnichenko, T.G. & Totolian, A. — Bacteriophage P13234 mediated intra- and intergroup transduction of antibiotic resistance among streptococci. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.*, 233:24-34, 1935.
13. Maxted, W.R. — The influence of bacteriophage on *Streptococcus pyogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 12:484-495, 1955.
14. Mitsuhashi, S.; Inoué, M.; Fuse, A.; Kaneko, Y. & Oba, T. — Drug resistance in *Streptococcus pyogenes*. *Jpn. J. Microbiol.*, 18:98-99, 1974.
15. Sanders, E.; Foster, M.T. & Scott, D. — Group A beta-hemolytic streptococci resistant to erythromycin and lincomycin. *N. Engl. J. Med.*, 278:538-540, 1968.
16. Wannamaker, L.W.; Almquist, S. & Skjold, S. — Intergroup phage reactions and transduction between group C and group A streptococci. *J. Exp. Med.*, 137:1338-1353, 1973.

## Epidemiologia da resistência plasmidial a drogas em salmonelas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro\*

Fernando Portela Câmara  
& Maria Amélia Cardoso

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

### Resumo

13,2% das salmonelas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro apresentaram plasmídios R transferíveis a 37° e pertencentes ao grupo Fi<sup>-</sup>. Todas as salmonelas eram do grupo B (15 *S. typhimurium* e 2 *S. agona*), sugerindo pressões seletivas para tais plasmídios, atuando em humanos ou animais domésticos susceptíveis a infecções por este grupo de microrganismos.

### Summary

*Epidemiology of drug resistance plasmids in *Salmonella* isolated from sewage of Rio de Janeiro*

13,2% of *Salmonella* isolated from sewage of Rio de Janeiro showed Fi<sup>-</sup> R plasmids transferable at 37°C. These strains were always of B group (15 *S. typhimurium* and 2 *S. agona*), which suggests seletive pressures working on humans and/or domestic animals in which occur infections with this group of bacteria.

### Introdução

Plasmídios conferindo resistência a drogas antibacterianas têm se tornado um elemento amplificador nos problemas de saúde pública, associados a infecções bacterianas, particularmente àquelas responsáveis por infecções intestinais\*\*. A existência de tais plasmídios exige o redimensionamento de toda a estratégia, utilizada no controle destas infecções, anulando o efeito da abordagem terapêutica e colocando o problema a nível de prevenção primária\*\*. Daí a importância de se estudar a epidemiologia da resistência a drogas e se esta característica tem poder disseminativo (plasmídios auto-transferíveis) ou não, além da dinâmi-

ca das populações de enterobactérias no ambiente e dos meios de controlá-las.

No Rio de Janeiro, estamos começando a desenvolver um projeto cujo objetivo é estudar a epidemiologia da resistência a drogas, em *Salmonelas* isoladas do ambiente e de surtos epidêmicos.

Pouco se sabe a respeito, em nosso meio. O único trabalho, que analisa populações de *Salmonelas* em esgotos do Rio de Janeiro é o de Hofer & Costa (4) sem, contudo, fazer referência às características dos antibiogramas nos grupos isolados.

O presente trabalho consiste nos primeiros passos dados neste sentido, sendo utilizada amostras da coleção de *Salmonelas* isoladas em

\* Financiado pelo CNPq (Proc. 2222.1418/77 — PIG II), CEPG/UFRJ e FINEP (B-76-79-074).

\*\* Câmara, F.P. — Disseminação de fatores de resistência a drogas entre enterobactérias: aspectos epidemiológicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., vol. 12 (em publicação), 1878.

1977, de esgotos da cidade do Rio de Janeiro, pela equipe do Dr. G.A. Costa, bem como uma parte da coleção original, citada no trabalho de Hofer & Costa (4).

## Material e Métodos

As salmonelas foram testadas quanto à sua pureza e seus antibiogramas conduzidos de acordo com Bauer & col. (2). Amostras apresentando resistência foram testadas para a concentração mínima inibitória (CMI) de cada droga, de acordo com as recomendações de Anderson & Threlfall (1).

Os experimentos de conjugação foram realizados a 30 e 37°C, de acordo com Yoshida & col. (6), sendo usadas, como receptoras, as linhagens *Escherichia coli* K12 LR-1 e HfrH. A linhagem LR-1 derivou da K12 ( $\lambda$ ) por tratamento com o fago  $\lambda$ imm<sup>434</sup>, para cura da lisogenia e, em seguida, tratada com rifampicina (100 $\mu$ g/ml) e ácido nalidíxico (100 $\mu$ g/ml), para aquisição de resistência a estas drogas. A linhagem HfrH (cedida pelo Dr. K.B. Low) foi também tratada com as drogas citadas, nas concentrações indicadas, para aquisição de resistência. Os transconjugantes eram testados para o caráter Fi dos plasmídios, com o fago F-específico R17 (cedido pelo Dr. Diógenes Santos), de acordo com o procedimento descrito em Coetze & col. (3). O meio seletivo utilizado era o agar MacConkey, adicionado de rifampicina (100 $\mu$ g/ml) e ampicilina (20 $\mu$ g/ml) ou tetraciclina (20 $\mu$ g/ml) os transconjugantes obtidos eram novamente testados no meio seletivo em que foram originalmente isolados. A freqüência de conjugação era calculada como a razão entre o número de transconjugantes e o número de receptores (1).

As drogas testadas foram: ampicilina (Ap), estreptomicina (Sm), carbenicilina (Cb), cloranfenicol (Cm), tetraciclina (Tc), gentamicina (Gm), canamicina (Km), ácido nalidíxico (An) e a associação sulfametoazol-trimetropin (Ba).

## Resultados e Discussão

Das 129 amostras recebidas, 17 (13,2%) apresentaram multirresistência às drogas antibacterianas testadas nos padrões mostrados na Tabela 1. Destas, 15 eram *Salmonella typhimurium* e 2 eram *S. agona*. Observa-se, portanto, que a multirresistência se concentra em salmonelas do sorotipo B, de maior interesse para a nosologia médica, fato significativo se levarmos em conta que, entre as salmonelas recebidas, encontravam-se representantes dos sorotipos B, C, D, E e F, em proporções mais ou menos equivalentes (G.A. Costa, comunicação pessoal).

Para saber se esta característica era transmissível ou não, realizamos testes de conjugação para os marcadores Ap e Tc. Estes marcadores mostraram-se transferíveis, numa freqüência de conjugação cuja ordem de grandeza era de 10<sup>-3</sup> (limites entre 6,6 × 10<sup>-4</sup> e 1,7 × 10<sup>-3</sup>) e tendo 37°C como a temperatura ótima de transferência (a 30°C a freqüência era 10 vezes menor, em média). Os transconjugantes, selecionados com ampicilina ou tetraciclina, nas amostras em que apareciam estas duas marcas simultaneamente, eram testados em "replicating" contra tetraciclina e ampicilina, respectivamente, com consequente crescimento, sugerindo que estas duas marcas genéticas estariam ligadas nestas amostras.

**Tabela 1** — Padrões de resistência e concentrações mínimas inibitórias para as diversas drogas testadas em Salmonelas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro

Microrganismo	Padrão de Resistência	Número de Amostras
<i>S. typhimurium</i>	ApCb	1
	SmTc	2
	ApCbSmTcGmKmCmAN ApCbSmTcGmKmCmANBa	11
<i>S. agona</i>	ApCbSmGmKmBaAN	1
	ApCbSmTcGmKmCmBaAN	1

CMIs ( $\mu$ g/ml) apresentadas: Ap, 1000; Cb, 1000; Sm, 125 (2 amostras apresentaram 30); Tc, 125-250; Gm 6,25-12,5; Cm, 310; Km, 1000; Ba, 1000; AN, 100.

Este dado, juntamente com o fato da resistência plasmidial estar concentrada em salmonelas do grupo B, sugerem pressões seletivas atuando em humanos e animais homotérmicos, onde circulam estes microrganismos em seu ciclo epidemiológico. Por outro lado, tem sido comum o relato de plasmídios termossensíveis, em salmonelas (5), onde pressões seletivas estão atuando no meio ambiente, onde raramente a temperatura de coleções de água ultrapassa os 30°C. Nossas amostras tiveram seu caráter plasmidial estável a 42°C (48 horas de incubação), além da termoestabilidade de conjugação já referida.

Os transconjugantes obtidos quando a linhagem receptora era a *E. coli* HfrH, mostraram ser do grupo F'+, pelo teste de lise com o fago R17.

As amostras aqui estudadas foram isoladas no ano de 1977 (G.A. Costa, comunicação pessoal). 44 salmonelas isoladas na primeira metade da década de 60, também em esgotos da cidade do Rio de Janeiro (4) e das quais 24 eram *S. typhimurium*, mostraram-se todas sensíveis às drogas citadas, sugerindo que mecanismos seletivos passaram a operar em épocas mais recentes.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Gobert A. Costa, da Universidade Gama Filho, a gentileza de nos fornecer as amostras para a feitura deste trabalho bem como pela identificação das 17 salmonelas estudadas.

### Referências Bibliográficas

1. Anderson, E.S. & Threlfall, E.J. — The characterization of plasmids in the enterobacteria. *J. Hyg.*, 72:471-487, 1974.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Amer. J. Clin. Path.*, 45:493-496, 1966.
3. Coetzee, J.N.; Datta, N. & Hedges, R.W. — R factors from *Proteus rettgeri*. *J. Gen. Microbiol.*, 72:543-552, 1972.
4. Hofer, E. & Costa, G.A. — Investigação sobre a ocorrência de *Salmonela* em esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 70:221-236, 1972.
5. Smith, H.W.; Parsell, Z. & Gree, P. — Thermosensitive antibiotic resistance plasmids in enterobacteria. *J. Gen. Microl.*, 109:37-47, 1978.
6. Yoshida, Y.; Terawaki, Y. & Nakaya, R. — R plasmids with thermosensitive transferability in *Salmonela* strains isolated from humans. *Microbiol. Immunol.*, 22:735-743, 1978.

## **Observações sobre *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* Laveran, 1902 em bovino no Estado 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*

José Luiz D'Angelino  
Wanderley Pereira de Araújo

*Departamento de Patologia e Clínica Médicas,  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP  
& Antonio Carlos Gouveia*

*Instituto de Zootecnica de São Paulo,  
Av. Francisco Matarazzo, 455  
05001 São Paulo SP, Brasil*

### **Resumo**

*Trypanosoma theileri* foi encontrado em grande número no sangue de uma vaca de cinco anos de idade procedente de Bragança Paulista, Estado de São Paulo. O animal apresentou sintomas de distúrbios cardíaco-respiratórios e digestivos. A vaca foi submetida a intensivo tratamento de suporte, inclusive com Beronal. Exames de sangue foram realizados dois dias após e nenhum parasita foi detectado. O animal morreu duas semanas depois, quando foi necropsiado e as lesões registradas. Amostra de sangue do animal doente foi inoculada em animais de laboratório e resultou negativa, enquanto que a cultura em placas de ágar-sangue, incubadas a 37°C, examinadas 10 dias após, revelaram a presença de estádios de epimastigota. *T. theileri* sobreviveu mais de 10 dias em sangue conservado a 4°C. Como, à necrópsia, o animal apresentou muitos processos patológicos, que causaram a morte, *T. theileri* provavelmente aproveitou-se da má condição do animal e multiplicou-se intensivamente, resultando em alta parasitemia.

### **Summary**

*Observations on Trypanosoma (Megatrypanum) theileri in a bovine in the State of São Paulo, Brazil*

*Trypanosoma theileri* was found in large number in the blood of a five years-old cow from Bragança Paulista, State of São Paulo. The animal showed symptoms of cardiorespiratory and digestive disorders. The cow was submitted to an intensive support treatment which included Beronal. Blood examinations were performed two days after and no parasite was detected. The animal died two weeks later when it was necropsied and the lesions recorded. Blood sample from the ill animal was inoculated in laboratory animals and resulted negative, while the cultivation in blood agar plate incubated at 37°C for 10 days revealed the presence of epimastigote. *T. theileri* survived more than 10 days in blood kept at 4°C. As at the necropsy the animal showed many pathological processes causing its death *T. theileri* probably took advantage of the animal poor condition allowing its intensive multiplication resulting in high parasitaemia.

### **Introdução**

*Trypanosoma theileri*, hemoparasita relativamente comum em bovino, produz, geralmente, infecção latente, tornando-o portador sô. Só ocasionalmente, aparece, no sangue de bovi-

no, em número apreciável (6); por esta razão, é considerado, por muitos, como parasita destituído de importância. No entanto, muitos profissionais, no campo, julgam-no parasita potencialmente patogênico, sob certas circunstâncias (6). Tem sido encontrado também em di-

versas afecções, sem causa específica aparente, a não ser a presença maciça no sangue circulante (1, 5, 9, 10).

Escassos são os relatos sobre a presença deste polêmico protozoário em bovinos no Brasil. A primeira descrição de *Trypanosoma theileri* foi feita por Carini (2), em 1911, em bovino de São Paulo. Nova notificação foi feita só recentemente, por Correa & col. (3), também em São Paulo.

O objetivo do presente trabalho consistiu em relatar mais um caso de ocorrência de *T. theileri*, em bovino, no Estado de São Paulo, com o intuito de fornecer algum subsídio para o estudo desse parasita no Brasil.

## Material e Métodos

O animal da espécie bovina, trazido ao Hospital da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para internamento, era da raça Holandeza, Vermelha e Branca, idade de cinco anos, sexo feminino, pesando 465 quilogramas.

**Histórico** — Em julho de 1977, o animal participou da Exposição em Bragança Paulista. Ficou prenhe e teve febre aftosa após o parto; não houve recuperação do estado geral, embora debelados os processos infecciosos secundários. Apesar de tudo, ficou novamente prenhe em 04-10-1977, porém abortou quatro meses e meio depois. Seu estado geral piorou, manifestando sinais de insuficiência cardíaca, quando foi encaminhado para internamento (22-08-1978).

**Exame clínico** — Ao exame, foram constatadas inúmeras alterações, entre as quais, palidez das mucosas, anorexia, atonia do rúmen, aumento da área hepática, macicês na área pulmonar e hiperfonesa da primeira bulha cardíaca. Diarréia profusa foi observada 3 dias após o internamento. Não se constatou hipertermia, modificação de atitude ou qualquer sinal de aumento da sensibilidade dos órgãos examinados.

Após o exame clínico, o animal foi submetido a exames laboratoriais de rotina, tais como de sangue, urina e fezes.

**Cultura** — Para o cultivo de *Trypanosoma*, foram utilizados o meio de NNN, conforme Levine (8), distribuído em tubos de ensaio e em placas de Petri e ágar-sangue, à temperatura de

24°C e 37°C. As semeaduras foram realizadas, adicionando-se algumas gotas de sangue desfibrinado de coelho.

O sangue bovino, contendo o protozoário, conservado em geladeira a 4°C, foi cultivado repetidas vezes em ágar-sangue a 37°C.

**Inoculação em animais** — Seis camundongos, um cobaio e um bezerro, foram inoculados com sangue bovino contendo *Trypanosoma*. A observação desses animais foi feita durante 30 dias, após a inoculação.

**Mensuração** — Foi feita utilizando a câmara clara com aumento linear de 1250X. Foram medidos 43 exemplares de *Trypanosoma*, em esfregaço sanguíneo, fixado em álcool metílico e corado pelo método de Giemsa.

**Tratamento** — Foi submetido a tratamento intensivo com medicamentos reidratantes, desintoxicantes e vitaminas. Cardiotônicos e antibióticos foram ministrados para combate ao problema cárdio-respiratório. Ainda, para sustar a diarréia, usou-se benzetamide + cloranfenicol (Landic) e diacetamino acetato do 4,4 diaminodiazominobenzeno (Beronal), para tentar combater o *Trypanosoma*.

**Necrópsia** — À necrópsia, foram averiguadas lesões macro e microscópicas. Decalques de vários órgãos foram examinados após a coloração pelo método de Giemsa.

## Resultados

O exame de sangue revelou anemia e leucocitose, sendo esta ligeira no início, mas com a evolução atingiu 72.000 leucócitos por mm<sup>3</sup> com acentuada neutrofilia.

Na urina, verificou-se ligeiro aumento dos teores de urobilinogênio.

O exame de fezes revelou infecção por helmintos, *Strongyloidea* e *Eurytrema* sp.

No exame a fresco, bem como nos esfregaços corados, foi encontrado grande número de *Trypanosoma*. Pela morfologia, suspeitamos tratar-se de *T. theileri*. O sangue coletado foi semeado em meios de cultura e inoculado em animais.

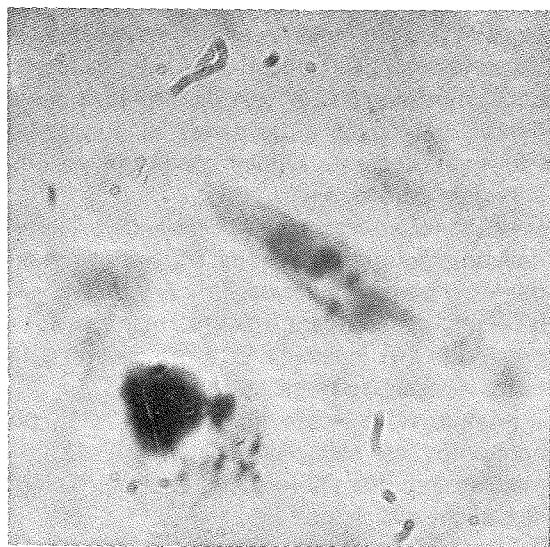
Em ágar-sangue a 37°C, foi observado bom crescimento do *Trypanosoma*. Ligeiro desenvolvimento foi detectado em ágar-sangue a

24°C e não houve crescimento no meio de NNN.

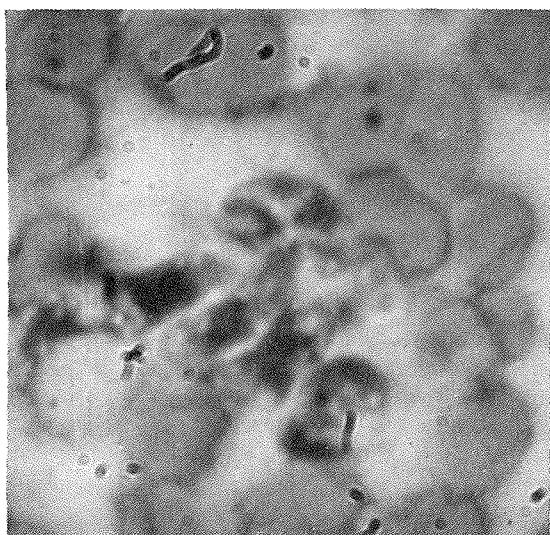
No meio de ágar-sangue que se mostrou mais adequado conseguimos apenas uma subcultura e o repique era realizado cada 10 dias.

Esfregaços, realizados a partir dessas culturas, corados pelo método de Giemsa, revelaram *Trypanosoma* em estádio de epimastigota. Apresentaram-se ou sob forma isolada, ou em pequenos grupos, ou ainda em massa (Figuras 1, 2 e 3).

**Figura 1** — *T. theileri* em cultura. Formas em divisão. Aumento original 1000X



**Figura 2** — *T. theileri* em cultura. Formas em divisão. Aumento original 1000X



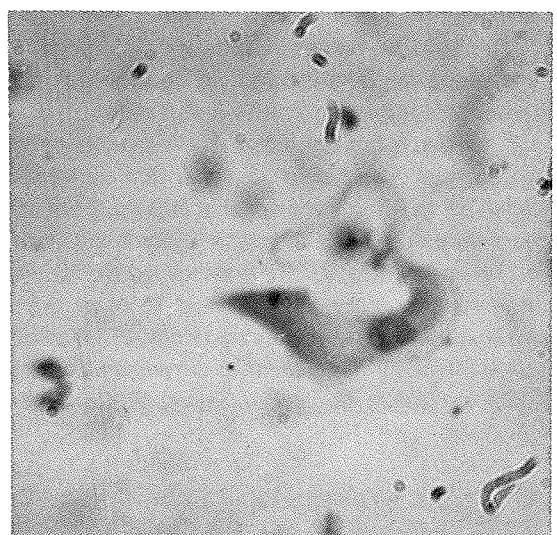
**Figura 3** — Massa de *T. theileri* em cultura. Aumento original 1000X



O flagelado, mantido a 4°C, semeado em ágar-sangue, em diferentes oportunidades, demonstrou ser viável por mais de 10 dias, como observado por Woo & col. (13) e Splitter & Soulsby (11).

Os parasitas, em esfregaço sanguíneo, apresentaram com a extremidade posterior do corpo nitidamente afilada, cinetoplasto grande e na posição subterminal, flagelo livre longo e com a membrana ondulante bem desenvolvida (Figura 4).

**Figura 4** — *T. theileri* em esfregaço de sangue bovino. Aumento original 1000X



As mensurações de 43 exemplares forneceram os seguintes dados: distância entre cinetoplasto ao meio do núcleo, 6,2 a 10,6 $\mu\text{m}$  ( $\bar{X} = 8,6\mu\text{m}$ ); comprimento do flagelo livre, de 2,5 a 15 $\mu\text{m}$  ( $\bar{X} = 7,5\mu\text{m}$ ); comprimento do corpo, sem o flagelo, de 16,9 a 38,7 $\mu\text{m}$  ( $\bar{X} = 27,7\mu\text{m}$ ) e o comprimento do corpo, com o respectivo flagelo, de 20 a 52 $\mu\text{m}$  ( $\bar{X} = 34,5\mu\text{m}$ ).

A diarréia cedeu ao tratamento ministrado e o protozoário desapareceu do sangue circulante, dois dias após a aplicação de Beronal. Apesar do tratamento intensivo, não houve melhoria no estado geral do animal, que veio a morrer duas semanas após internamento, quando foi submetido à necropsia.

À necropsia, foram encontradas lesões de hepatite apostematoso, endocardite valvular, pneumonia bilateral, esplenite apostematoso e *Eurytrema coelomaticum*, no pâncreas. Micropicicamente, foram constatadas miocardite embólico-purulenta, tromboendocardite bacteriana, pneumonia abcedante, cirrose biliar e hepática purulenta abcedante, nefrite embólico-purulenta, esplenite purulenta abcedante e hipoplasia linforreticular.

Decalques de órgãos como baço, fígado, rim e linfonodos não revelaram a presença do parasita.

Não foi possível constatar a infecção em animais de laboratório, observados durante 30 dias após a inoculação de sangue bovino. O bezerro inoculado morreu sem condições de exame alguns dias após a infecção.

## Discussão

O estudo de características morfológicas de *Trypanosoma*, encontrado no sangue bovino, demonstra estarmos frente a *T. theileri*.

*T. theileri* é um flagelado relativamente grande, ao qual é atribuído geralmente a dimensão de 60-70 $\mu\text{m}$ , mas a máxima de 109 $\mu\text{m}$ , bem como mínima de 25 $\mu\text{m}$  tem sido relatada (6). Toure (12), no Senegal, cita o encontro de formas pequenas, medindo 43,3 $\mu\text{m}$  e formas grandes medindo 95,3 $\mu\text{m}$ . Levine & col. (9), nos Estados Unidos, mencionam a dimensão de 34 a 40 $\mu\text{m}$  exclusive flagelo, e Ewing & Carnahan

(4), observaram a dimensão de 12 a 46 $\mu\text{m}$  (29,5 $\mu\text{m}$ ) exclusive flagelo, também nos Estados Unidos. Woo & col. (13), no Canadá, fizeram estudos mais acurado e relatam valores como 31,2 a 64,9 $\mu\text{m}$  (47,6 $\mu\text{m}$ ), inclusive flagelo. No presente trabalho, observamos *Trypanosoma* medindo de 20 a 52 $\mu\text{m}$  (34,5 $\mu\text{m}$ ), incluindo o flagelo.

Em vista das diferenças verificadas por vários autores, Keymer (7) fez estudo biométrico detalhado, entre diversas linhagens de *T. theileri* de diferentes hospedeiros e entre outras espécies de *Trypanosoma* de ruminantes, como *T. ingens*, *T. trachelaphi* e *T. cephalophi*, conhecidas como *Trypanosoma* semelhantes a *T. theileri*. Chegou à conclusão de que as espécies de *Trypanosoma* não podiam ser identificadas em bases morfológicas; apesar da diferença considerável, verificada entre várias linhagens, havia, aparentemente regular graduação, de uma linhagem para outra.

Hoare (6) admite a possibilidade de existirem dois grupos (ou espécies) de *Trypanosoma*: um menor, correspondendo a *T. theileri* ( $\pm 50,6\mu\text{m}$ ), cosmopolita e outro, maior, correspondendo a *T. ingens* ( $\pm 81,0\mu\text{m}$ ), restrito a determinadas áreas tropicais.

Keymer (7) e Hoare (6) preferem reter, por enquanto, as espécies existentes, até que maiores estudos sobre características biológicas sejam realizados.

O animal parasitado apresentou, em consequência da baixa de resistência induzida por várias afecções, grande quantidade de *T. theileri* no sangue. Esse desapareceu dois dias após a aplicação do Beronal; no entanto, não mostrou qualquer melhora, provavelmente devido ao extenso comprometimento de diversos órgãos. Este fato não permitiu avaliar adequadamente a influência.

## Agradecimentos

Agradecemos aos Doutores Adayr Mafuz Saliba, Idercio Signorini e Tamara Nikitin do Departamento de Patologia e Clínica Médicas da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela colaboração prestada ao presente trabalho.

## Referências Bibliográficas

1. Anônimo — *Trypanosoma theileri* in Virginia cattle. Javma., 149:1294, 1966.
2. Carini, A. — Présence de trypanosomes chez bovidés, à São Paulo. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 4:191-192, 1911.
3. Correa, F.M.A.; Campos Neto, O. & Sogayar, R. — Reencontro do *Trypanosoma (Megatrypanum) theileri* Laveran, 1902 em bovino no Estado de São Paulo, Brasil. Anais do XVI Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Salvador, p. 91, 1978.
4. Ewing, S.A. & Carnahan, D.L. — Occurrence of *Trypanosoma theileri* in bovine peripheral blood. Javma., 150:1131-1132, 1967.
5. Grunert, E. & Andresen, P. — A fatal central nervous system disorder in an unweaned calf infected with *Trypanosoma theileri* (a short communication). Dt. Tierarztl. Wschr., 77:304-306, 1970.
6. Hoare, C.A. — The trypanosomes of mammals: a zoological monograph. Oxford & Edinburgh, Blackwell Scientific Publications, p. 125-151, 1972.
7. Keymer, I.F. — Investigations on the duiker (*Sylvicapra grimmia*) and its blood protozoa in Central Africa. Phil. Trans. Roy. Soc. B., 255:33, 1969 apud Hoare, 1972.
8. Levine, N.D. — Protozoan parasites of domestic animals and of man. 2. ed. Minneapolis, Minnesota, USA, Burgess Publishing, 1973.
9. Levine, N.D.; Watrach, A.M.; Kantor, S. & Hardenbrook, H.J. — A case of bovine trypanosomiasis due to *Trypanosoma theileri* in Illinois. J. Parasitol., 42:553, 1966.
10. Ristic, M. & Trager, W. — Cultivation at 37°C of a trypanosome (*Trypanosoma theileri*) from cows with depressed milk production. J. Protozool., 5:146-148, 1958.
11. Splitter, E.J. & Soulsby, E.J.L. — Isolation and continuous cultivation of *Trypanosoma theileri* in media containing tissue culture fluids. Exptl. Parasitol., 21:137-148, 1967.
12. Toure, S.M. — Description complémentaire de *Trypanosoma theileri* Laveran, 1902. Mention particulière de formes observées en Casamance (Rép. du Sénégal). Rev. Elev. Méd. vet. Pays trop., 21:365-373, 1968.
13. Woo, P.; Soltys, M.A. & Gillick, A.C. — Trypanosomes in cattle in Southern Ontario. Canad. J. comp. Med., 34:142-147, 1970.

## **Qualidade microbiológica da carne bovina moída a nível de varejo e sua avaliação pela prova da resazurina\***

Mathilde R. de Camargo\*\*

Murilo Graner

Alcides Martinelli Filho

Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ-USP, Caixa Postal 9,  
13400 Piracicaba SP, Brasil

& Décio Barbin

Departamento de Matemática e Estatística da ESALQ-USP

### **Resumo**

Amostras de carne bovina moída, obtidas em supermercados e açougues de Piracicaba, SP, foram analisadas quanto à: 1) contagem total de bactérias (a 21, 32 e 35°C); 2) enumeração de coliformes (totais e *Escherichia coli*); 3) prova da resazurina (a 30 e 35°C); 4) determinação do pH; 5) avaliação subjetiva da qualidade. A contagem total e a enumeração de coliformes resultaram, geralmente, em valores elevados, que, para grande número das amostras, ultrapassaram limites máximos propostos ou adotados para o produto. O tempo de redução da resazurina esteve negativamente correlacionado com a contagem total de bactérias e com a enumeração de coliformes, e positivamente correlacionado com o período de conservação sob refrigeração, que foi de 1 a 3 dias. É proposta uma classificação da carne bovina moída comercial, com base na prova da resazurina, em nível aceitável (tempo de redução da resazurina  $> 8,0\text{h}$ ), questionável (tempo de redução  $> 5,0\text{h}$  e  $\leq 8,0\text{h}$ ) e inaceitável (tempo de redução  $\leq 5,0\text{h}$ ). O limite máximo de 6,1 é sugerido para o pH do produto.

### **Summary**

*Microbiological quality of raw ground beef and its evaluation through a resazurin test*

Samples of raw ground beef, taken from supermarkets and meat stores in Piracicaba, SP, were analysed for: 1) total bacterial count (at 21, 32 and 35°C); 2) coliform (total and *Escherichia coli*) enumeration; 3) resazurin reduction test (at 30 and 35°C); 4) pH determination; 5) subjective evaluation of product quality. It was found that: 1) total counts and coliform numbers were generally high, for many samples exceeding proposed microbiological standards or recommended limits. Resazurin reduction time was negatively correlated with total bacterial counts and with the number of coliforms, and positively correlated with shelf life (not greater than 3 days) of the product under refrigeration temperatures. The resazurin test studied was suggested for the routine examination of ground beef quality. A maximum limit for pH (6.1) was suggested also for the product.

### **Introdução**

A carne moída é uma forma comum e importante na comercialização da carne bovina a nível de varejo, pois constitui fonte de proteína de boa qualidade, é mais acessível à faixa da população com menor poder aquisitivo e pode

ser utilizada, em refeições, de maneiras variadas e práticas. Por outro lado, na elaboração, o produto está sujeito a maior contaminação por microrganismos, e é um meio altamente favorável à multiplicação de bactérias (15, 18).

A flora bacteriana presente na carne moída, a nível de varejo, depende da flora presente na

\* Trabalho realizado no Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ-USP.

\*\* Ex-bolsista da Fapesp (Mestrado).

carne utilizada na elaboração, das condições higiênicas durante o processamento, da temperatura e do tempo de armazenamento antes da venda do produto (6). A deterioração do produto pode resultar em alterações da cor, do odor (ácido ou pútrido) e no aparecimento de induto viscoso (7, 15). A deterioração pode ser organolepticamente detectável, quando a contagem total de bactérias atinge  $10^6$  organismos/g (1).

Há autores que consideram a carne moída como produto que oferece pequeno risco à saúde humana, por tratar-se de alimento que é conservado sob refrigeração e consumido cozido (9); esse risco depende, entretanto, das temperaturas, envolvidas no armazenamento refrigerado e no preparo para o consumo.

A contagem total de bactérias da carne moída pode ser recomendada para a avaliação e o controle da qualidade microbiológica (5, 18). No estabelecimento de valores limites ou de padrões microbiológicos, a temperatura de incubação das placas de Petri deve ser especificada; assim, por exemplo, contagens feitas a 20, 21 ou 28°C resultaram em valores superiores às feitas a 35°C (8, 17, 22). A contagem realizada a 20°C reflete melhor a flora presente no produto e permite melhor estimar a sua "vida de prateleira" (9).

Valores limites ou padrões microbiológicos têm sido recomendados ou adotados em diferentes países, para a contagem total de bactérias da carne moída (1, 2, 17). No Estado de São Paulo, o decreto que "Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas" (11) estabeleceu o limite máximo de  $3 \times 10^6$  bactérias/g para as "... carnes cruas, preparadas ou não, ...", sem especificar, todavia, a temperatura de incubação das placas de Petri.

O mesmo decreto (11) estabeleceu, para coliformes fecais (expressão geralmente usada para caracterizar uma população de bactérias com elevada proporção de *Escherichia coli*) (3), o limite máximo de  $3 \times 10^2$  bactérias/g. Além de ser indicadora clássica de contaminação direta ou indireta de alimentos com matéria fecal (21), a bactéria *E. coli* pode, segundo trabalhos realizados nos últimos anos (3, 13), ser, ela própria, um agente patogênico para o homem.

O emprego de indicadores de óxido-redução, para a avaliação da qualidade microbiológica da carne, tem sido estudado ou sugerido por vários autores (4); uma dessas substâncias utilizadas para a carne bovina moída é a resazurina (12, 16, 19).

Na deterioração aeróbia da carne, o pH do produto pode ter seu valor aumentado de 5,5 para 6,5 (4). Segundo alguns autores (14), a composição da flora da carne bovina moída depende do valor inicial do pH e altera-se de acordo com o valor que resulta da ação dessa flora sobre a carne. Limites máximos (por exemplo, 5,85) têm sido propostos para o pH do produto, a serem considerados juntamente com outras informações resultantes da análise microbiológica (2).

Este trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: 1) contribuir para o conhecimento da qualidade microbiológica da carne bovina moída, comercializada a nível de varejo em Piracicaba, SP; 2) desenvolver o estudo da avaliação dessa qualidade através da prova da resazurina, conforme anteriormente proposta (12, 16).

## Material e Métodos

*Amostragem* — Foram analisadas 20 amostras, provenientes de supermercados e açougues (10 de cada tipo de estabelecimento), no 2º semestre de 1977, e outras 20 (provenientes dos mesmos estabelecimentos), no 1º semestre de 1978. As amostras, obtidas pela manhã (cerca de 8h e 30min), foram, imediatamente a seguir, levadas ao laboratório, para o início das análises.

*Contagem total de bactérias* — Foi realizada de acordo com as recomendações da "American Public Health Association" (20), incubando-se as placas de Petri a 21°C (72h) e 32°C (48h); em adição, foi utilizada a temperatura de 35°C (48h).

*Enumeração de coliformes* — A técnica do número mais provável (NMP) foi utilizada, para coliformes totais e *Escherichia coli*, empregando-se o caldo de lactose-bile-verde brilhante em tubos de fermentação e o meio ágar-eosina-azul de metíleno em placas de Petri (20).

*Prova da resazurina* — Foi realizada em tubos de ensaio contendo caldo nutritivo com 0,5% de extrato de levedura, indicador de óxido redução e óleo mineral sobrenadante (12); incubação foi feita a 30 e a 35°C.

*Determinação do pH* — O pH foi determinado com um potenciômetro, em suspensão preparada com carne moída e água destilada (partes iguais), no início das análises (pH inicial) e a ca-

da 24h de armazenamento refrigerado (ver item seguinte), até o aparecimento de indícios de deterioração (pH final). Foi calculada a diferença ( $\Delta \text{pH}$ ) entre o pH final e o inicial de cada amostra.

**Avaliação subjetiva da qualidade** — Porções das amostras, pesando cerca de 100g cada, foram armazenadas sob refrigeração ( $4,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$ ), em placas de Petri previamente esterilizadas e contidas em envoltório de polietileno (baixa densidade). O material assim preparado foi submetido, periodicamente (a cada 24h), à avaliação de cor e odor.

**Análise estatística** — Foi realizada a análise da variância (teste F) e, quando necessário para a comparação de médias, o teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade. Os esquemas das análises da variância utilizados encontram-se nas Tabelas 1 a 4. No caso das análises relativas à contagem total e à enumeração de coliformes, foi utilizada a transformação dos dados segundo a expressão  $y = \log x$ .

Foram calculados também os coeficientes de correlação linear simples para as séries de 40 dados obtidos, utilizando-se o teste t para a verificação da significância (10).

**Tabela 1** — Contagem total de bactérias e prova da resazurina: esquemas das análises individuais da variância para supermercados e açougueiros

Causa da variação	Graus de liberdade	
	Contagem total	Prova da resazurina
Temperaturas de incubação (T)	2	1
Períodos de amostragem (P)	1	1
Interação T × P	2	1
(Tratamentos)	(5)	(3)
Blocos	9	9
Resíduo	45	27
Total	59	39

**Tabela 2** — Contagem total de bactérias e prova da resazurina: esquemas das análises conjuntas da variância para supermercados e açougueiros

Fonte da variação	Graus de liberdade	
	Contagem total	Prova da resazurina
Tipos de estabelecimento (E)	1	1
Períodos de amostragem (P)	1	1
Temperaturas de incubação (T)	2	1
Interação E × P	1	1
Interação E × T	2	1
Interação P × T	2	1
Interação E × P × T	2	1
Resíduo médio*	90	54

\* Oriundo das análises individuais para supermercados e açougueiros.

**Tabela 3** — Coliformes (totais e *E. coli*): esquema das análises individuais da variância para supermercados e açougueiros

Causa da variação	Graus de liberdade
Períodos de amostragem (P)	1
Blocos	9
Resíduo	9
Total	19

**Tabela 4** — Coliformes (totais e *E. coli*): esquema da análise conjunta da variância para supermercados e açougueiros

Causa da variação	Graus de liberdade
Tipos de estabelecimento (E)	1
Períodos de amostragem (P)	1
Interação E × P	1
Resíduo médio*	18

\* Oriundo das análises individuais para supermercados e açougueiros.

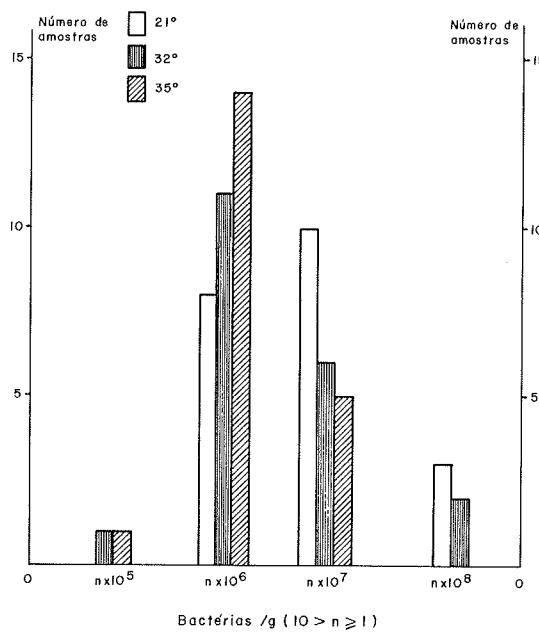
## Resultados e Discussão

Tanto para supermercados como para açougueiros, os valores obtidos na contagem total de bactérias, para o 2º semestre de 1977 (período de entre-safra na comercialização da carne bovina), foram significativamente ( $p < 0,01$ ) mais elevados que os obtidos no 1º semestre de 1978 (período de safra). A distribuição desses valores pode ser visualizada nas Figuras 1 e 2. Não foi constatada diferença significativa entre supermercados e açougueiros, na análise conjunta da variância para os dois tipos de estabelecimento, o que sugere uma semelhança entre os mesmos, quanto à variável considerada.

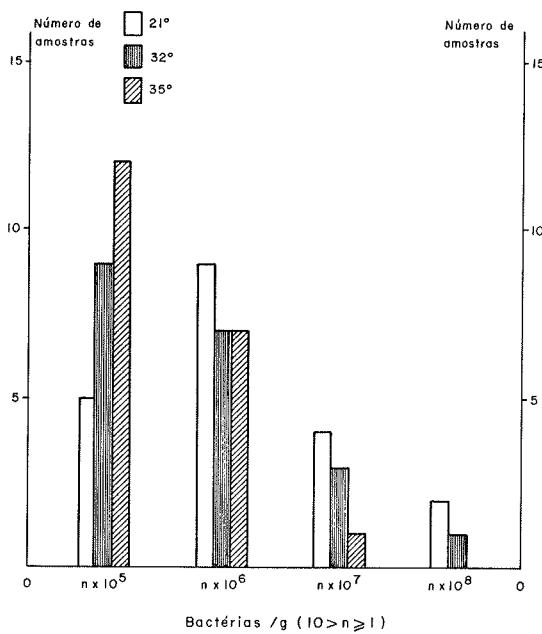
Os valores obtidos nas contagens a  $21^\circ\text{C}$  foram significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevados que os observados a  $35^\circ\text{C}$ , tanto para um como para outro tipo de estabelecimento (Figuras 1 e 2). Na análise conjunta para supermercados e açougueiros, constatou-se que as contagens a  $32^\circ\text{C}$  foram significativamente ( $p < 0,05$ ) mais elevadas que as realizadas a  $35^\circ\text{C}$ . Não foi constatada diferença significativa entre os valores resultantes de incubação a  $21^\circ\text{C}$  e os obtidos a  $32^\circ\text{C}$ . As contagens realizadas às diferentes temperaturas estiveram positivamente correlacionadas:  $r = 0,85$  a  $0,90$  ( $p < 0,01$ ).

Considerando-se o limite máximo de  $3 \times 10^6$  bactérias/g, adotado para o produto no Estado de São Paulo (11), verificou-se que o mesmo foi ultrapassado por 42,5%, 57,5% e 70% das amostras, para as temperaturas de incubação

**Figura 1** — Distribuição das contagens totais de bactérias no 2º semestre de 1977



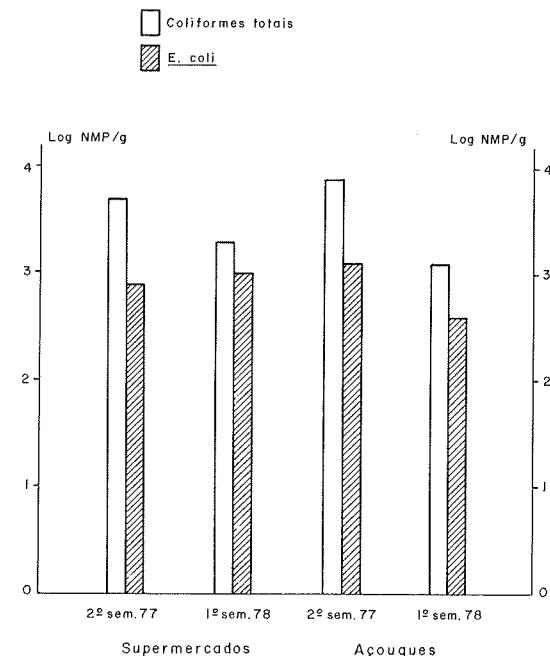
**Figura 2** — Distribuição das contagens totais de bactérias verificadas no 1º semestre de 1978



de 35, 32 e 21°C, respectivamente. Apesar de haver algumas amostras com contagens superiores a  $10^8$  bactérias/g, não foram detectados indícios de deterioração no início das análises, como observado anteriormente por alguns autores (1).

Todas as amostras analisadas foram positivas, tanto para coliformes totais como para *Escherichia coli*. Os resultados da enumeração desses microrganismos podem ser visualizados na Figura 3. Observou-se que 67,5% das amostras analisadas quanto ao NMP de *E. coli* ultrapassaram o limite máximo de  $3 \times 10^2$  bactérias/g, adotado para coliformes fecais no Estado de São Paulo (11). Não foi constatada diferença significativa entre os períodos de amostragem e entre os tipos de estabelecimento; portanto, nas condições do presente trabalho, a qualidade do produto adquirido em supermercados foi semelhante à encontrada em açougues, no que diz respeito às variáveis em questão, o mesmo ocorrendo para os dois períodos de amostragem.

**Figura 3** — Enumeração de coliformes totais e *E. coli* (NMP/g), para dois tipos de estabelecimentos e dois semestres

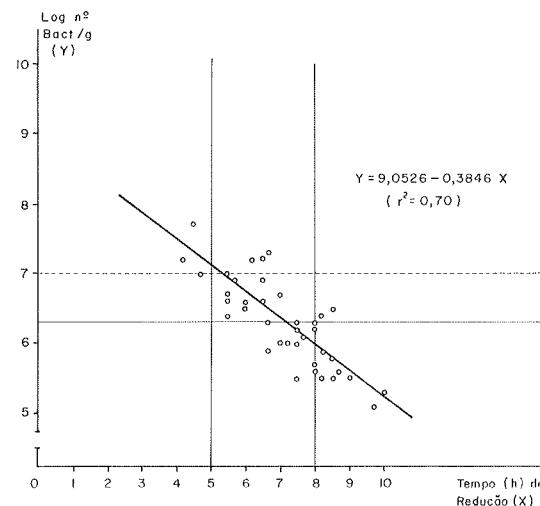


Tanto o NMP de coliformes totais, como o de *E. coli*, estiveram positivamente correlacionados ( $p < 0,01$ ) com as contagens totais de bactérias às três temperaturas de incubação (21, 32 e 35°C); os maiores coeficientes de correlação foram observados para a temperatura de 35°C da contagem total: 0,77 (coliformes totais) e 0,66 (*E. coli*). Alguns autores (22) não encontraram, anteriormente, este tipo de correlação. O NMP de coliformes totais e o de *E. coli* estiveram altamente correlacionados ( $r = 0,91$ ;  $p < 0,01$ ).

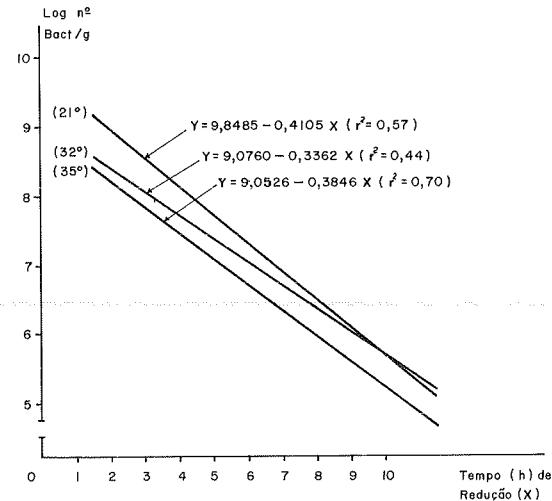
Na prova da resazurina, a temperatura de incubação de 35°C resultou em diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) do tempo de redução do indicador, em relação à temperatura de 30°C (análise conjunta). Todavia, melhor correlação foi observada entre o tempo de redução a 30°C, de um lado, e a contagem total de bactérias (a 21, 32 e 35°C), de outro (Tabela 5; Figuras 4 e 5). A redução da resazurina esteve ainda correlacionada com a enumeração de coliformes (Tabela 5), o pH inicial das amostras ( $r = -0,53$ ;  $p < 0,01$ ) e o tempo de conservação do produto sob refrigeração ( $r = 0,49$  e 0,45, para as temperaturas de 30 e 35°C, respectivamente;  $p < 0,01$ ).

Com base nos resultados obtidos e considerando-se ainda limites máximos sugeridos ou adotados para a contagem total de bactérias (1, 5, 11, 17), é proposta a classificação para a carne bovina moída a nível de varejo, quanto à

**Figura 4** — Relação entre a contagem total de bactérias (35°C) e o tempo de redução da resazurina (30°C)



**Figura 5** — Relação entre a contagem total de bactérias (21, 32 e 35°C) e o tempo de redução da resazurina (30°C)



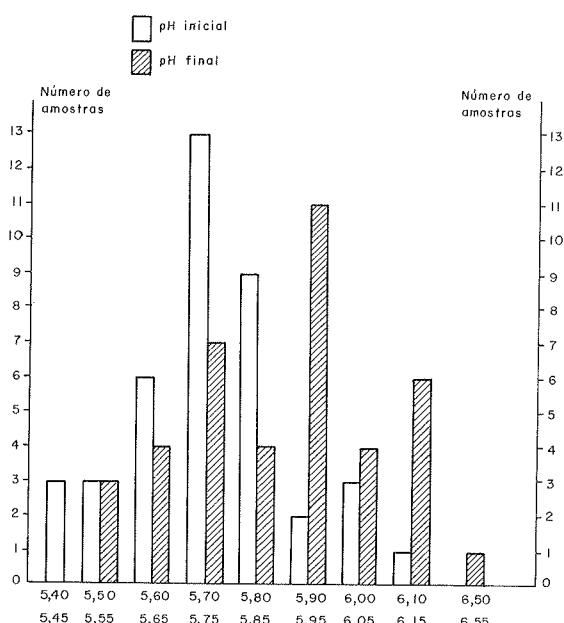
**Tabela 5** — Tempo de redução da resazurina, contagem total de bactérias e enumeração de coliformes: coeficientes de correlação significativa ( $p < 0,01$ )

Redução da resazurina	Contagem total de bactérias			Enumeração de coliformes	
	21°C	32°C	35°C	Totais	<i>E. coli</i>
30°C	-0,75	-0,66	-0,84	-0,81	-0,73
35°C	-0,68	-0,60	-0,82	-0,80	-0,72

prova da resazurina a 30°C: *aceitável* (tempo de redução da resazurina  $> 8,0\text{h}$ ), *questionável* (tempo de redução  $> 5,0\text{h}$  e  $\leq 8,0\text{h}$ ) e *inaceitável* (tempo de redução  $\leq 5,0\text{h}$ ).

Na Figura 6 podem ser visualizadas as distribuições correspondentes ao pH inicial e ao final das amostras. Com exceção de quatro amostras, todas as demais apresentaram elevação do pH durante o armazenamento refrigerado ( $\Delta \text{pH} = 0,05$  a 0,70), o que era esperado (4); em três delas, porém, observou-se redução do pH ( $\Delta \text{pH} = -0,10$ ,  $-0,15$  e  $-0,20$ ).

O pH inicial esteve positivamente correlacionado ( $p < 0,01$ ) com a contagem total de bactérias a 21°C ( $r = 0,57$ ), a 32°C ( $r = 0,44$ ) e a 35°C ( $r = 0,44$ ), e com o pH final ( $r = 0,71$ ).

**Figura 6** — Distribuição do pH inicial e final das amostras

Correlação positiva ( $r = 0,48$ ), entre o pH do produto e a contagem total de bactérias ( $32^\circ\text{C}$ ), foi constatada anteriormente por alguns autores (2). No presente trabalho, é sugerido o limite máximo de 6,10 para o pH da carne bovina moída comercial, como critério a ser utilizado, juntamente com outros métodos de avaliação da qualidade microbiológica.

Alterações da cor e/ou do odor do produto ocorreram dentro de um período de um a três dias. Ao contrário do que era esperado (9), não foi constatada correlação significativa entre o tempo de conservação sob refrigeração e a contagem total de bactérias a  $21^\circ\text{C}$ ; mas correlação negativa ( $r = -0,37$ ;  $p < 0,05$ ) pode ser observada entre a "vida de prateleira" do produto e a contagem a  $35^\circ\text{C}$ .

## Referências Bibliográficas

- Al-Delaimy, K.S. & Stiles, M.E. — Microbial quality and shelf-life of raw ground beef. *Can. J. Public Health*, 66:317-321, 1975.
- Chambers, J.; Brecbill, D.O. & Hill, D.S. — A microbiological survey of raw ground beef in Ohio. *J. Milk Food Technol.*, 39:530-535, 1976.
- Chordash, R.A. & Insalata, N.F. — Incidence and pathological significance of *Escherichia coli* and other indicator organisms in food and water. *Food Technol.*, 32:54-58, 1978.
- Dainty, R.H. — The control and evaluation of spoilage. *J. Food Technol.*, 6:209-224, 1971.
- Elliot, R.P. & Michener, H.D. — Microbiological standards and handling codes for chilled and frozen foods: a review. *Appl. Microbiol.*, 9:452-468, 1961.
- Foster, J.F.; Fowler, J.L. & Ladiges, W.C. — A bacteriological survey of ground beef. *J. Food Prot.*, 40:790-794, 1977.
- Frazier, W.C. — Food microbiology. 2. ed. New York, McGraw Hill, p. 265-272, 1967.
- Goepfert, J.M. — The aerobic plate count, coliform and *Escherichia coli* content of raw ground beef at the retail level. *J. Milk Food Technol.*, 39:175-178, 1976.
- Goepfert, J.M. & Kim, H.V. — Behavior of selected food borne pathogens in raw ground beef. *J. Milk Food Technol.*, 38:449-452, 1975.
- Gomes, F.P. — Curso de estatística experimental. 8. ed. São Paulo, Nobel, 1978.
- Governo do Estado de São Paulo — Decreto nº 12.486. Aprova Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas. São Paulo, Diário Oficial, p. 3-4, 1978.
- Graner, M.; Martinelli Filho, A. & Cruz, V.F. — Microbiologia da carne moída. II — Avaliação de qualidade por método modificado, baseado na redução da resazurina. Anais da Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queirós", 30:203-211, 1973.
- Insalata, N.F. — Enteropathogenic *E. coli*: a new problem for the food industry. *Food Technol.*, 27:56-58, 1973.
- Labadie, J.; Fournaud, J. & Dumont, B.L. — Relationship between the pH and the microflora of beef and veal ground meat. *Ann. Technol. Agric.*, 24:193-203, 1975.
- Lechowich, R.V. — Microbiology of meat. In: — The science of meat and meat products. 2. ed. San Francisco, W.H. Freeman, p. 230-275, 1971.
- Martinelli Filho, A.; Graner, M. & Cruz, V.F. — Microbiologia da carne moída. III — Avaliação da qualidade em diferentes épocas do ano. Anais da Esc. Sup. Agric. "Luiz de Queirós", 32:81-87, 1975.
- Pivnick, H.; Erdman, I.E.; Collins-Thompson, D.; Roberts, G.; Johnyson, A.; Conley, D.R.; Lapachelle, G.; Purvis, V.T.; Foster, R. & Milling, M. — Proposed microbiological standards for ground beef based on a Canadian survey. *J. Milk Food Technol.*, 39:408-412, 1976.
- Rogers, R.E. & McCleskey, C.S. — Bacteriological quality of ground beef in retail markets. *Food Technol.*, 11:318-320, 1957.
- Saffle, R.L.; May, K.N.; Hamid, H.A. & Irby, S.D. — Comparing three rapid methods of detecting spoilage in meat. *Food Technol.*, 15:465-467, 1961.
- Sharif, J.M. — Métodos recomendados para o exame microbiológico de alimentos. 2. ed. São Paulo, Polígrono, 1972.
- Thatcher, F.S. & Clark, D.S. — Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration. Toronto, University of Toronto, p. 25-27, 1968.
- Westhoff, D. & Feldstein, F. — Bacteriological analysis of ground beef. *J. Milk Food Technol.*, 39:401-404, 1976.

