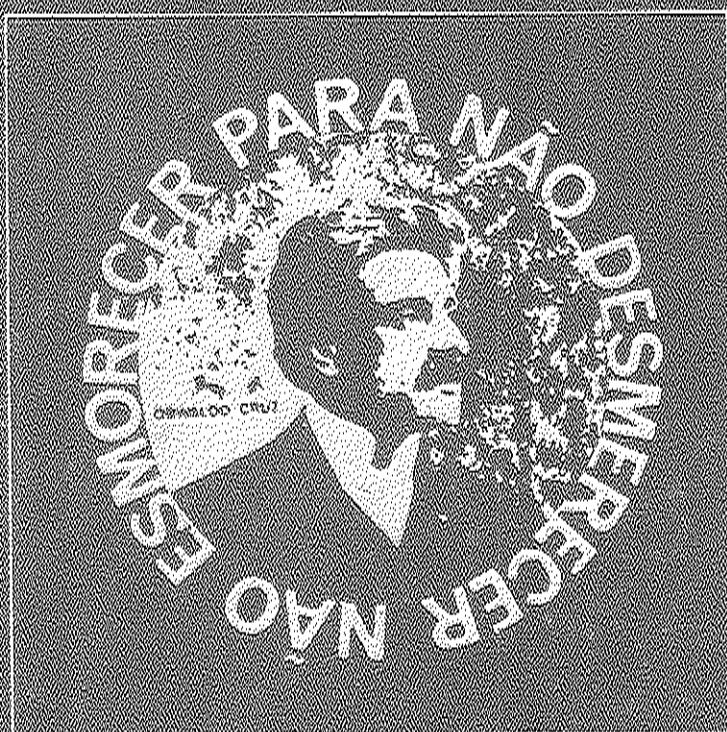


# Revista de Microbiologia



**SBM**

Sociedade  
Brasileira de  
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 13 Número 2 Abr.-Jun. 1982

## 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 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 de 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 nanq (n) e pico (p), ao invés de milímicro ( $m\mu$ ) micromicro ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro ( $\mu m$ ;  $10^{-6}m$ ), ao invés de micro ( $\mu$ ); nanômetro ( $nm$ ;  $10^{-9}m$ ), ao invés de milímicro ( $m\mu$ ); e Angstroms ( $\text{\AA}$ ;  $10^{-10}m$ ). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ( $\mu g/ml$ ) ou microlitros por litro ( $\mu l/litro$ ). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

**NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS** — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (8<sup>a</sup> ed., 1974) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada 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, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem e subcapítulos devem ser colocados junto à margem esquerda do manuscrito, incluídos essencialmente pela ordem: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas.

A página título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, 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.

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 um ponto e vírgula e o último por &. Na seção 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, títulos de 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 árabico 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 descrevendo pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção 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, provendo-se todos os elementos de figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulados devem ser feitas em papel brillante, 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.

**NOTA 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.



Parte da Série

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374  
Cid. Universitária - USP  
05508-900 — São Paulo/SP

## 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\$ 3.000,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) 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: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

**Composição** AM Produções Gráficas Ltda.

**Impressão** Gráfica Editora Hamburg Ltda.

## 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 CETESEB 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, a cada dois anos, 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.

## **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

Rhodia S.A.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA  
Dept. de Microbiologia - ICB II - USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária  
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL  
Site: [www.revmicro.sjb.net](http://www.revmicro.sjb.net)

# Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 13 Abril-Junho 1982 Número 2

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 13(2)

## CONTEÚDO

- José R. P. Olagorta 101 Sistemas de reparos de DNA
- Jorge Guerrero & Cerli R. Gattas 110 Substâncias imunomoduladoras: visão geral
- Maria L.C. Rosa & Flávio Alterthum 116 Efeito da nistatina em esferoplastos de *Saccharomyces cerevisiae* contendo diferentes esteróis incorporados na membrana
- Marcelo Magalhães 124 Método simples e econômico para cultivar *Campylobacter fetus subsp. jejuni*
- Marlene de A. Andrade & Gisélia P. da Silva 126 Incapacidade do β-caroteno de proteger *Escherichia coli* J-5 da ação letal da luz ultra violeta
- Jan Dirk van Elsas 131 Características de um novo bacteriófago de *Bacillus megaterium* com cabeça alongada
- Mônica M. Linhares & Elisa G.C. Penido 135 Produção de enterotoxinas e resistência a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarréia
- Margaretti S. Oliveira 143 Pesquisa de fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica*
- Antonio F.P. de Castro  
Marlene B. Serafim  
& Manuel A.S.C. Portugal
- Maria R.F. de Toledo  
Marlene B. Serafim  
Denise S.P.Q. Horton  
& Deise P. Falcão
- Margarida D. M. Camargos  
José Noronha Peres  
& Sinval M. de Melo 151 Marcadores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*. III – Correlação entre provas “in vivo” e “in vitro”
- Marcelo Magalhães 156 Uretrites não gonocócicas masculinas associadas a *Chlamydia*, *Ureaplasma* e *Trichomonas*

## CONTENTS

- DNA repair systems
- Immunomodulating substances: an overview
- The effect of nystatin on spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae* containing different sterols incorporated into the plasma membrane
- Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* Subsp. *jejuni*
- Incapacity of β-carotene to protect *Escherichia coli* J-5 against ultra violet light lethal action
- Properties of a new *Bacillus megaterium* bacteriophage with elongated head
- Production of enterotoxin and drug resistance among strains of colibacilli isolated from swine diarrhea
- Search for virulence factors in *Yersinia enterocolitica*
- Markers of virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. III – Relation between “in vitro” and “in vivo” tests
- Male nongonococcal urethritis associated with *Chlamydia*, *Ureaplasma* and *Trichomonas*

José R.S. Chaves Jussara P. do Nascimento & Marguerite Scott Pereira	161	Vigilância de <i>Influenza</i> no Rio de Janeiro: estudo sorológico	<i>Influenza surveillance in Rio de Janeiro: a serological study</i>
Maria T. Martins Laurinda A. Soares Antonia G. Molina & Edda de Rizzo	166	Sensibilidade de diferentes linhagens celulares na detecção de enterovírus humanos presentes em águas	<i>Sensitivity of cell strains for detection of human enteroviruses present in water</i>
Eva Miranda de Souza	173	Estudo de <i>Entamoeba gingivalis</i> em boca de crianças	<i>Study of Entamoeba gingivalis on children's mouth</i>
Célia L. de L.F. Ferreira & Robert Bradley Jr.	180	Determinação de biotina e ácido fólico em iogurte preparado com diferentes culturas starters	<i>Biotin and folic acid determination in yogurt prepared from different starter cultures</i>
Angela M.W. Barreto & Paulo P. Gontijo Filho	187	Crescimento de micobactérias isoladas de solo e de esgoto, em presença de petróleo, diesel e hidrocarbonetos	<i>Growth of mycobacteria from soil and sewage on petrol, diesel and hydrocarbons</i>

José R. Pellon Olagorta

*Massachusetts Institute of Technology  
Cambridge, Massachusetts 02139, USA*

## Summary

The DNA repair systems have received increasing attention in recent years mainly because their intervention in mutagenesis and carcinogenesis. The present review presents well known facts together with late developments in DNA repair, stressing the enzymatic events involved in bacterial cells.

## Resumo

### *Sistemas de reparos de DNA*

Sistemas de reparo do DNA têm merecido atenção, principalmente devido ao papel que exercem em mutagênese e carcinogênese. São revistos fatos já estabelecidos e avanços recentes, no assunto, com ênfase nos eventos enzimáticos, envolvidos nas células bacterianas.

## Introduction

The inherent stability of the DNA molecule was thought some time ago to be the main reason for the low frequency of spontaneous mutations or, in other words, for keeping constant the genetic information of the species. Today it seems clear that the DNA repair processes are essential for the maintenance of the integrity of the DNA molecule.

The DNA repair processes have received renewed attention lately due to their interrelation with cell survival and mutagenic and carcinogenic transformations. The relationship between DNA repair and carcinogenesis is supported by evidence showing that some inherited human disorders, associated with defects in DNA repair, result in a significantly higher prevalence of certain types of cancer (62).

Due to the fairly good understanding of the enzymes involved in DNA repair systems, it seems a useful approach to arrange the repair processes in groups with respect to the particular type of enzymatic events involved. Classification by this scheme should become increasingly precise as our knowledge of repair develops.

The purpose of this review is to present an update on established facts and recent developments in this rapidly expanding field.

**Photoreactivation** — It is the process by which a specific photoreactivating enzyme binds to the intrastrand cyclobutane-type dimer formed between adjacent pyrimidines by UV radiation, monomerizes it *in situ* upon absorption of a photon in the wavelength range 300-600nm

(visible light), and in this way restores the DNA to its original undamaged state. It has been shown to be completely specific for pyrimidine dimers (53, 63) and to prevent the lethal and mutagenic consequences of UV irradiation, being considered a constitutive error-free DNA repair system (58). Photoreactivating enzymes have been detected in both prokaryotes and eucaryotes, including human cells (66, 67). The main limitation of this system is its lack of versatility due to its high specificity for pyrimidine dimers.

**Excision repair** — This repair process takes advantage of the fact that the DNA has two complementary copies of information (two strands); thus, it can dispose of damaged nucleotides in one strand without losing the capacity to regain the correct nucleotide sequence upon replication, using the undamaged strand as template. It is a major system of DNA repair. The individual steps in this repair process are the following (for the removal of a pyrimidine dimer formed in the DNA by UV radiation, which is the most studied case (Fig. 1).

a) Specific recognition of the dimer by a DNA glycosylase, and posterior DNA strand scission of the resulting apyrimidinic site (19, 23, 40). Recently, it has been reported that the same enzyme (DNA glycosylase) seems to possess both the glycosylase and the apurinic/apyrimidinic DNA endonuclease activities (40).

The enzyme would cleave first the N-glycosyl bond between the 5'-pyrimidine of the dimer and its corresponding sugar, and then it would proceed to cleave the phosphodiester bond on the 3'-side of the apyrimidinic site (this is the bond between both pyrimidines of the dimer originally) (23, 40, 60). Alternatively, the cleavage of the apyrimidinic site may occur at its 5' side, and then step b (exonucleolytic excision) would not need to be bidirectional as it is proposed (23).

b) Exonucleolytic excision of the dimer as part of a small oligonucleotide. The excision would have to be bidirectional, because the removal of the 3' sugar is also needed to provide a 3'-hydroxyl site for DNA polymerization (23).

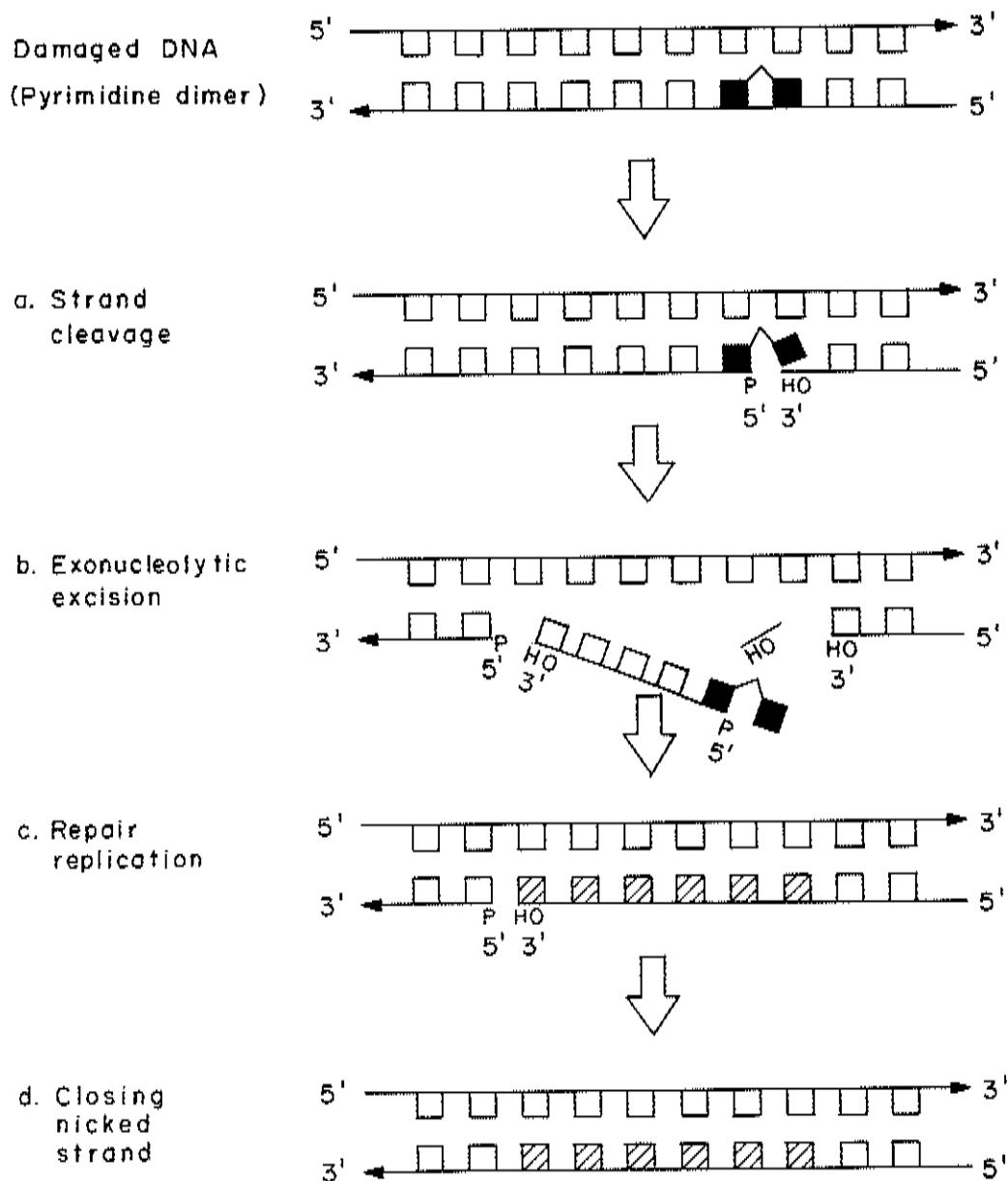
c) Repair replication catalyzed by a DNA polymerase. The 3'-hydroxyl end serves as primer and the complementary strand as template. Steps b and c may occur simultaneously (for example, DNA polymerase I has both exonucleolytic and replicative activities) (37).

d) Closing of the nicked strand, catalyzed by a DNA ligase.

The recognition of the DNA damage by the site-specific endonucleases is the rate-limiting step in the process (19). A number of DNA glycosylases and endonucleases have been isolated which are each specific for a particular lesion (31), proving that some of these enzymes recognize specifically particular lesions, but it is unlikely that specific endonucleases exist for each of the many possible kinds of damage known to stimulate excision repair. The advantage of complex enzymatic systems is that they may recognize the distortion of the DNA structure rather than specific lesions (21) and this will result in a much more versatile nucleolytic activity. The *E. coli* *uvrA*, *uvrB*, and *uvrC* gene products are required for DNA incision in a process that is energy requiring (31).

The recognition of the DNA damage by DNA glycosylases may not be significant in certain types of DNA damage. For example, it is known that most of these enzymes are heat labile *in vitro*, and it will be logical to think that they are inactivated after heat damage at mild temperatures (50-52°C) which are known to induce DNA damage (1, 42, 43). *E. coli* uracil-DNA glycosylase is about 80% inactivated after 5min. at 50°C (31), and *E. coli* 3-methyladenine-DNA glycosilase has a half-life of about 10 minutes at 45°C in several buffers (31, 50). The major endonuclease for apurinic sites in *E. coli* which at the same time has exonuclease activity (exonuclease III), is also heat-labile with a half-life of about 2 minutes at 45°C in common buffers (31). However, this heat sensitivity could also turn out to be a regulatory mechanism. In this sense, it appears that the apurinic acid en-

**Figure 1 — Scheme of the steps involved in the nucleotide excision repair of DNA**



The arrows indicate the direction of DNA synthesis. See text for details

: Pyrimidine dimer

: DNA synthesis during replication.

endonuclease activity of exonuclease III (endonuclease VI, previously referred as endonuclease II) induces single strand breaks in *E. coli* cells subjected to mild heat (50-52°C) (17, 70).

Recently, preliminary evidence for simpler DNA repair pathways at apurinic or apyrimidinic (AP) sites has appeared. The AP sites may be directly filled with the appropriate base by a base insertion enzyme or "insertase" (10, 33). These enzymes would act in apurinic sites in double stranded DNA but not in depurinated single stranded DNA.

Steps b and c (exonucleolytic excision and repair replication) of the nucleotide excision repair process in *E. coli* involve almost certainly a multiplicity of enzymes and no single mutation has been shown to eliminate either excision or resynthesis once the incision has occurred (20). On the other hand, a large number of mutations affect these processes *in vivo* (20). Three enzymes from *E. coli* are able to remove dimers selectively from incised DNA *in vitro*. These are the 5'-exonuclease activity of DNA polymerase I (28), the 5'-exonuclease activity of DNA polymerase III (32), and the single-strand specific exonuclease VII (5). In the repair replication step, it seems that DNA polymerase I is the main enzyme implicated because this enzyme, unlike polymerase II and III, has the ability to bind *in vitro* at nicks generated by dimer-specific endonucleases. Also, the number of molecules per cell is largest in the case of DNA polymerase I (about 400 polymerase I, 40 polymerase II, and 10 polymerase III per cell) (14).

The repair patches after DNA damage in *E. coli* are heterogeneous in size. A majority of lesions results in short patches (15-30 nucleotides) while a small proportion produce long patches (several hundred nucleotides) (20). These two size classes appear to result from the operation of different enzymatic pathways (20, 37) being the polymerase I primarily responsible for short-patch repair (constitutive, error-free) and other polymerases responsible for long patches (7). Because neither polymerase II nor polymerase III seem to bind at nicks, it is possible that the initial DNA incision would have to be expanded to a gap by a 3'-exonuclease before the resynthesis by polymerases II and/or III (18). It seems now that long-patch repair is an inducible function requiring protein synthesis and depending on *recA* and *lexA* genes (2, 20, 71). Both findings suggest that long patches are a manifestation of the SOS error-prone repair system operating in the nucleotide excision repair (the SOS repair will be described later).

In mammalian cells it appears that there are two pathways for repair synthesis, resulting in different patch sizes, referred as "long patch" and "short patch" by analogy with the bacterial systems. However, these terms have very different meanings in the two kinds of cells, being the size of the short patch in bacteria similar to that of the long patch in mammalian cells (20). The short-patch pathway (3-4 nucleotides) in mammalian cells is active on the major damage products of agents termed "X-ray like" (i.e., alkylating agents) (47), and repair by this pathway is mostly completed in one to two hours (41, 51). The long-patch pathway (~35 nucleotides) (20) is active on damage by agents termed "UV-like" (i.e., aflatoxin B<sub>1</sub>) (47). This kind of damage is thought to distort the DNA helix. The repair period lasts many hours (20).

*Post replication repair* — Due to the presence of bulky, noncoding lesions in the DNA (such as pyrimidine dimers), the replicating DNA fork is blocked, and it seems to reinitiate synthesis at some point beyond the blockage (54, 58). This DNA repair system is constitutive and it was initially described in nucleotide excision-deficient mutants of *E. coli* that cannot remove the lesions (dimers) before the arrival of the replication fork (54, 58). If these cells are grown with <sup>3</sup>H-thymidine for 10 minutes after a UV treatment, they incorporate radioactivity into DNA that sedimented more slowly in alkaline sucrose gradients than DNA synthesized in unirradiated control cells. After incubation for about 1 hour in nonradioactive medium, the slowly sedimenting DNA was converted into a form that cosedimented with DNA from control cells (20). Rupp and coworkers (55) demonstrated that gaps are formed in newly synthesized daughter-strand DNA which are approximately 1000 nucleotides in length and occur in proportion to the number of pyrimidine dimers produced in the DNA by UV radiation. These gaps in daughter DNA are filled by parental DNA stretches. In principle, it is not expected that this system causes mutations because it does not involve DNA

replication from a noninstructive template (34). The system does not repair the DNA damage which remains (12), but the secondary lesions originated during the replication of the damaged DNA template.

Post replication repair requires a functional *recA* gene, which is also needed for genetic recombination, and in fact post replication repair is sometimes referred to as recombinational repair. The post replication repair requires, however, functions not needed for genetic recombination, because the *recF* and *lexA* mutations inhibit this kind of repair (4, 13) but not genetic recombination (20, 25). The mechanism(s) of post-replication repair could be different in prokaryotic, eucaryotic and mammalian cells (12, 48, 49, 55).

*SOS repair* — When the gaps produced by replication of damaged DNA overlap in both daughter DNA strands, the restoration of the original nucleotide sequence is not possible by recombination. In this case, the nucleotides would have to be inserted from a noninstructive template. Upon induction of the SOS system, the cell is able to insert nucleotides without regard for correct base pairing, introducing mistakes (mutations) but preventing the possible lethal event caused by the unrepaired damage. This error-prone system comprises a group of inducible responses to DNA damage in *E. coli* that seem to be coordinately regulated (16, 20): a. Inhibition of cell division; b. Inhibition of postirradiation DNA degradation; c. Induced bacterial mutagenesis; d. Weigle reactivation; e. Weigle mutagenesis; f. Induction of prophage  $\lambda$ ; g. Filamentous growth.

The induction of this error-prone repair system is the basis for the bacterial tests for mutagens and carcinogens, like, for example, the Ames test (16, 22). These inducible responses are dependent upon *recA* and *lexA* and involve the activation of a cellular mutator activity which mutates both damaged and undamaged DNA (71). The induced signal appears to be the formation of DNA degradation products. The induction of the SOS responses is paralleled by the increase in the intracellular concentration of the *recA* gene product (protein X) (11, 38, 39). The model for this regulation accepts a constitutive low-level production of *recA* protein which, upon induction, is converted to a form having a protease activity that inactivates a number of repressors including the *lexA* protein, which appears to be the *recA* repressor, thus derepressing its own synthesis (20, 52). The *recA* protein is in this way able to derepress also the synthesis of different proteins controlling the SOS functions (29).

It appears now that the error-prone replication past lesions, termed "transdimer synthesis", may involve the modification of one or more of the normal DNA polymerases, causing an alteration in their fidelity or in their proofreading function (20). Particularly, there is indirect evidence supporting the involvement of DNA polymerase III in error-prone transdimer synthesis (3). The exact relation of transdimer synthesis to post-replication repair and SOS repair is difficult to establish at this time.

*Adaptative response* — This inducible, error-free repair system has been described in *E. coli* after exposure to sublethal concentrations of various alkylating agents (56, 58, 59). Adapted cells present an increased survival and lower mutation frequency when challenged with high concentrations of the alkylating agent than do non-adapted cells (27). The adaptative response seems to be a different repair system from the previously studied ones because, with few exceptions, all the repair-deficient strains are able to develop resistance to alkylating agents (58).

The mechanism of adaptation at the molecular level is not well known (58), but it might involve inducible DNA-glycosilases or the recently discovered dimethylases. It has been proposed that the demethylases act, for example, upon guanine damaged by methylation at the O<sup>6</sup> position, removing the methyl group without otherwise altering the DNA. This adaptation process would be then the simpler type of repair, reversing directly the damage caused in the DNA.

Different mutations affecting the adaptative response have been reported recently (26, 58, 61), and they will be useful in understanding the mechanisms involved at the molecular level. The adaptative response has been shown to occur also in mammalian cells (57).

*Mismatch repair* — It operates by the correction of mismatches between the parental and newly replicated strand and it is thought to provide an efficient final method of increasing the accuracy of DNA replication. Mismatched bases seem to be corrected by a process resembling excision repair (46). This system could increase the accuracy of the other repair systems or check the final result after other repair systems have finished their work. Recently, a study on the base specificity of mismatch repair has been reported (6).

For the mismatch correction to function properly, the cell has to distinguish the newly synthesized from the parental strand. Radman & col. (15, 45) have provided evidence that the newly synthesized strand may be recognized because it is undermethylated (35). DNA in *E. coli* contains two naturally methylated bases, N<sup>6</sup>-methyl adenine and 5-methyl cytosine. These methyl groups are added enzymatically fairly slowly after DNA replication and only about 1% of adenine residues and 0.4% of cytosine residues are methylated. *E. coli dam*<sup>+</sup> mutants deficient in generalized adenine methylation are spontaneous mutators (36), being this consistent with the hypothesis of the (adenine) methylation-instructed DNA repair of mismatched bases.

*Overview* — The picture which emerges from the data in DNA repair systems is that of a network of coordinated biochemical reactions rather than several separate repair pathways. This makes any attempt to classify the DNA repair systems at the same time difficult and artificial. The attempt to classify them by enzymatic events involved seems to hold the advantage of being able to improve as the knowledge of the biochemistry and genetics of the processes develops. As in many other cellular functions, the emphasis will go from the biochemical possibilities to their regulated interactions. The interrelations between the inducible and constitutive responses to lesion in DNA will have to be clarified further, being this needed for the understanding of the relationship between biochemical events and biological end points such as survival and mutagenesis.

It is important to remember that the DNA is *in vitro* in a supercoiled state (64) and this supercoiling affects every DNA related function, including repair (8, 24, 65, 68, 69). In some of the repair systems one strand of the DNA molecule is transiently cleaved, which may result in the loss of the DNA supercoiling (tertiary structure) (9,44), unless the rotation of the cleaved strand around its complementary one is restrained during the process. The repair of the original DNA tertiary structure after damage is a necessary (30, 42, 68), but still not thoroughly studied, step in order for the cell to recover completely.

### Acknowledgement

The comments and discussions of Dr. Reinaldo F. Gomez during the preparation of this manuscript are greatly appreciated.

### References

1. Bridges, B.A.; Ashwood-Smith, M.J. & Munson, R.J. — Susceptibility of mild thermal and of ionizing radiation damage to the same recovery mechanisms in *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35:193-196, 1969.
2. Bridges, B.A. & Mottershead, R.P. — Mutagenic DNA repair in *E. coli* VIII. *Molec. Gen. Genet.*, 162:35-41, 1978.

3. Bridges, B.A.; Mottershead, R.P. & Sedgwick, S.G. — Mutagenic DNA repair in *E. coli* III. *Molec. Gen. Genet.*, 144:53-58, 1976.
4. Bridges, B.A. & Sedgwick, S.G. — Effect of photoreactivation on the filling of gaps in DNA, synthesized after exposure of *E. coli* to ultraviolet light. *J. Bacteriol.*, 117:1077-1081, 1974.
5. Chase, J.W. & Richardson, C.C. — Exonuclease VII of *E. coli*: mechanism of action. *J. Biol. Chem.*, 249:4553-4561, 1974.
6. Claverys, J.P.; Mejean, V.; Gasc, A.M.; Galibert, F. & Sicard, A.M. — Base specificity of mismatch repair in *Streptococcus pneumoniae*. *Nuc. Acid. Res.*, 9:2267-2280, 1981.
7. Cooper, P.K. & Hanawalt, P.C. — Role of DNA polymerase I and the *rec* system in excision-repair in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 69:1156-1160, 1972.
8. Cozzarelli, N.R. — DNA gyrase and supercoiling of DNA. *Science*, 207:953-960, 1980.
9. Davison, P.F. — The rate of strand separation in alkali-treated DNA. *J. Mol. Biol.*, 22:97-108, 1966.
10. Deutsch, W.A. & Linn, S. — DNA binding activity from cultured human fibroblasts that is specific for partially depurinated DNA and that inserts purines into apurinic sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76:141-144, 1979.
11. Emmerson, P.T. & West, S.C. — Identification of protein X of *E. coli* as the *recA*<sup>+</sup>/*tif*<sup>+</sup> gene product. *Molec. Gen. Genet.*, 155:77-85, 1977.
12. Ganesan, A.K. — Persistence of pyrimidine dimers during postreplication repair in ultraviolet light-irradiated *E. coli* K-12. *J. Mol. Biol.*, 87:103-120, 1974.
13. Ganesan, A.K. & Seawell, P.C. — The effect of *lexA* and *recF* mutations on post-replication repair and DNA synthesis in *E. coli* K-12. *Molec. Gen. Genet.*, 141:189-205, 1975.
14. Gefter, M.L. — DNA replication. *Ann. Rev. Biochem.*, 44:45-78, 1975.
15. Glickman, B.W. & Radman, M. — *E. coli* mutator mutants deficient in methylation-instructed DNA mismatch correction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:1063-1067, 1980.
16. Gottesman, S. — Genetic control of the SOS system in *E. coli*. *Cell*, 23:1-2, 1981.
17. Grecz, N. & Bhatarakamol, S. — Apurinic acid endonuclease implicated in DNA breakage in *E. coli* subjected to mild heat. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 77:1183-1188, 1977.
18. Grossman, L.; Braun, A.; Feldberg, R. & Mahler, I. — Enzymatic repair of DNA. *Ann. Rev. Biochem.*, 44:19-43, 1975.
19. Grossman, L.; Riazuddin, S.; Haseltine, W.A. & Lindan, C. — Nucleotide excision repair of damaged DNA. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43:947-955, 1978.
20. Hanawalt, P.C.; Cooper, P.K.; Ganesan, A.K. & Smith, C.A. — DNA repair in bacteria and mammalian cells. *Ann. Rev. Biochem.*, 48:783-836, 1979.
21. Hanawalt, P.C. & Haynes, R.H. — Repair replication of DNA in bacteria: irrelevance of chemical nature of base defect. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 19:462-467, 1965.
22. Hartman, P.E. — Bacterial mutagenesis: review of new insights. *Environ. Mutagen.*, 2:3-16, 1980.
23. Haseltine, W.A.; Gordon, L.K.; Lindan, C.P.; Grafstrom, R.H.; Sharper, N.L. & Grossman, L. — Cleavage of pyrimidine dimers in specific DNA sequences by a pyrimidine dimer DNA glycosylase of *M. luteus*. *Nature*, 285:634-641, 1980.
24. Hays, J.B. & Boehmer, S. — Antagonists of DNA gyrase inhibit repair and recombination of UV-irradiated phage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:4125-4129, 1978.
25. Horii, Z.I. & Clark, A.J. — Genetic analysis of the *recF* pathway to genetic recombination in *E. coli* K-12: isolation and characterization of mutants. *J. Mol. Biol.*, 80:327-344, 1973.
26. Jeggo, P. — Isolation and characterization of *E. coli* K-12 mutants unable to induce the adaptative response to simple alkylating agents. *J. Bacteriol.*, 139:783-791, 1979.
27. Jeggo, P.; Defais, M.; Samson, L. & Schendel, P. — An adaptative response of *E. coli* to low levels of alkylating agent: comparison with previously characterized DNA repair pathways. *Mol. Gen. Genet.*, 157:1-9, 1977.
28. Kelly, R.B.; Atkinson, M.R.; Huberman, J.A. & Kornberg, A. — Excision of thymine dimers and other mismatched sequences by DNA polymerase of *E. coli*. *Nature*, 224:495-501, 1969.
29. Kenyon, C.J. & Walker, G.C. — DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 77:2819-2823, 1980.
30. Lavin, M.F. & Davidson, M. — Repair of strand breaks in superhelical DNA of ataxia telangiectasia lymphoblastoid cells. *J. Cell Sci.*, 48:383-391, 1981.

31. Lindahl, T. — DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog. Nuc. Acid Res. Mol. Biol.*, 22:135-192, 1979.
32. Livingston, D.M. & Richardson, C.C. — DNA polymerase III of *E. coli*: characterization of associated exonuclease activities. *J. Biol. Chem.*, 250:470-478, 1975.
33. Livneh, Z.; Elad, D. & Sperling, J. — Enzymatic insertion of purine bases into depurinated DNA *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76:1089-1093, 1979.
34. Maher, V.M. & McCormick, J.J. — DNA repair and carcinogenesis. In: — Grover, P.L., ed. — *Chemical carcinogens and DNA*. vol. 2. Florida, CRC, 1979.
35. Marinus, M.G. — Adenine methylation of Okazaki fragments in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 128:853-854, 1976.
36. Marinus, M.G. & Morris, N.R. — Pleiotropic effects of a DNA adenine methylation mutation (*dem-3*) in *E. coli* K-12. *Mutat. Res.*, 28:15-26, 1975.
37. Matson, S.W. & Bambara, R.A. — Short DNA repair patch length in *E. coli* is determined by the processive mechanism of DNA polymerase I. *J. Bacteriol.*, 146:275-284, 1981.
38. McEntee, K. — Protein X is the product of the *recA* gene of *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:5275-5279, 1977.
39. MacEntee, K.; Hesse, J.E. & Epstein, W. — Identification and radiochemical purification of the *recA* protein of *E. coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73:3979-3983, 1976.
40. Nakabeppu, Y. & Sekiguchi, M. — Physical association of pyrimidine dimer DNA glycosylase and apurinic/apyrimidinic DNA endonuclease essential for repair of ultraviolet-damaged DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:2742-2746, 1981.
41. Paterson, M.C. — Use of purified lesion-recognizing enzymes to monitor DNA repair *in vivo*. *Adv. Rad. Biol.*, 7:1-53, 1978.
42. Pellon, J.R. & Gomez, R.F. — Repair of thermal damage to the *E. coli* nucleoid. *J. Bacteriol.*, 145:1456-1458, 1981.
43. Pellon, J.R.; Ulmer, K.M. & Gomez, R.F. — Heat damage to the folded chromosome of *E. coli* K-12. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:358-364, 1980.
44. Pettijohn, D.E. — Prokaryotic DNA in nucleoid structure. *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 4:175-202, 1976.
45. Radman, K.; Villani, G.; Boiteux, S.; Kinsella, A.K.; Glickman, B.W. & Spadari, S. — Replication fidelity: mechanisms of mutation avoidance and mutation fixation. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 43:937-946, 1979.
46. Radding, C.M. — Genetic recombination: strand transfer and mismatch repair. *Ann. Rev. Biochem.*, 47:847-880, 1978.
47. Reagan, J.D. & Setlow, R.B. — Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens. *Cancer Res.*, 34:3318-3325, 1974.
48. Resnick, M.A. — The induction of molecular and genetic recombination in eucaryotic cells. *Adv. Radiat. Biol.*, 8:175-217, 1979.
49. Resnick, M.A.; Boyce, J. & Cox, B. — Postreplication repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 146:285-290, 1981.
50. Riazuddin, S. & Lindahl, T. — Properties of 3-methyladenine-DNA glycosylase from *E. coli*. *Biochem.*, 17:2110-2118, 1978.
51. Roberts, J.J. — The repair of DNA modified by cytotoxic, mutagenic, and carcinogenic chemicals. *Adv. Rad. Biol.*, 7:211-436, 1978.
52. Roberts, J.W.; Roberts, C.W. & Craig, N.L. — *E. coli recA* gene product inactivates phage  $\lambda$  repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:4714-4718, 1978.
53. Rupert, C.S. — Enzymatic photoreactivation: overview. In: — Hanawalt, P. & Setlow, R.B., eds. — Part A — Molecular mechanisms for repair of DNA. New York, Plenum Press, 1975.
54. Rupp, W.D. & Howard-Flanders, P. — Discontinuities in the DNA synthesized in an excision-defective strain of *E. coli* following ultraviolet irradiation. *J. Mol. Biol.*, 31:291-304, 1968.
55. Rupp, W.D.; Wilde, C.E.; Reno, D.L. & Howard-Flanders, P. — Exchange between DNA strands in ultraviolet-irradiated *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 61:25-44, 1971.
56. Samson, L. & Cairns, J. — A new pathway of DNA repair in *E. coli*. *Nature New Biology*, 267:281-282, 1977.
57. Samson, L. & Schwartz, J.L. — Evidence for an adaptive DNA repair pathway in CHO and human skin fibroblast cell lines. *Nature*, 287:861-863, 1980.

58. Schendel, P.F. — Inducible repair systems and their implications for toxicology. CRC Crit. Rev. Toxicol., 8:311-362, 1981.
59. Schendel, P.F.; Defais, M.; Jeggo, P.; Samson, L. & Cairns, J. — Pathways of mutagenesis and repair in *E. coli* exposed to low levels of simple alkylating agents. J. Bacteriol., 135:466-475, 1978.
60. Seawell, P.C.; Smith, C.A. & Ganesan, A.K. — *denV* gene of bacteriophage T4 determines a DNA glycosylase specific for pyrimidine dimers in DNA. J. Virol., 35:790-797, 1980.
61. Sedgwick, B. & Robins, P. — Isolation of mutants of *E. coli* with increased resistance to alkylating agents: mutants deficient in thiols and mutants constitutive for the adaptative response. Molec. Gen. Genet., 180:85-90, 1980.
62. Setlow, R.B. — Repair deficient human disorders and cancer. Nature, 271:713-717, 1978.
63. Setlow, J.K. & Setlow, R.B. — Nature of the photoreactivable ultraviolet lesion in deoxyribonucleic acid. Nature, 197:560-562, 1963.
64. Sinden, R.R. & Pettijohn, D.E. — Chromosomes in living *E. coli* cells are segregated into domains of supercoiling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:224-228, 1981.
65. Smith, G.R. — DNA supercoiling: another level for regulating gene expression. Cell, 24:599-600, 1981.
66. Sutherland, B.M. — Photoreactivating enzyme from human leukocytes. Nature, 248:109-112, 1974.
67. Sutherland, B.M.; Chamberlain, M.J. & Sutherland, J.C. — Deoxyribonucleic acid photoreactivating enzyme from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 12:4200-4205, 1973.
68. Ulmer, K.M.; Gomez, R.F. & Sinskey, A.J. — Ionizing radiation damage to the folded chromosome of *E. coli* K-12: repair of double-strand breaks in DNA. J. Bacteriol., 138:486-491, 1979.
69. Von Wright, A. & Bridges, B.A. — Effect of *gyrB*-mediated changes in chromosome structure on killing of *E. coli* by ultraviolet light: experiments with strains differing in DNA repair capacity. J. Bacteriol., 146:18-23, 1981.
70. Williams-Hill, D.M. & Grecz, N. — Further evidence for the role of apurinic acid endonuclease in DNA damage. Abs. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol., Dallas, Texas, U.S.A., p. 105, 1981.
71. Witkin, E.M. — Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *E. coli*. Bacteriol. Rev., 40:869-907, 1976.

## Immunomodulating substances: an overview \*

Jorge Guerrero

Pitman-Moore, Inc. P.O. Box 344  
Washington Crossing, NJ 08560, USA

& Cerli R. Gattas

Department of Biology, Princeton University, Princeton, NJ 08540 USA

### Summary

A review of the immunomodulating activity of *Bacillus Calmette Gérin* (BCG), *Propionibacterium* spp. (*Corynebacterium parvum*), interferon, levamisole, and thymopoietin, as stabilizers of immunological homeostasis when injected into mammals. There is no common mechanism of action, but all of the immunomodulators influence the activation of macrophages. Levamisole and thymopoietin reveal some similar effects on cell mediated immuneresponses. The model of effect of thymopoietin pentapeptide (TP5) in experimental infections of *Babesia microti* in hamsters is emphasized and reveals a diminished parasitemia during the acute infection.

### Resumo

#### *Substâncias imunomoduladoras: visão geral*

Uma revisão da atividade imunomoduladora de *Bacillus Calmette Gérin* (BCG), *Propionibacterium* spp. (*Corynebacterium parvum*), intérferon, levamisole e timopoietina, como estabilizadores da homeostasia imunológica, quando injetados em mamíferos. Não há mecanismo comum de ação entre os imunoestimuladores, mas todos influenciam a ativação de macrófagos. Levamisole e timopoietina revelam alguns efeitos similares nas imunorespostas celulares. O modelo do efeito da timopoietina pentapeptídio (TP5) em infecções experimentais por *Babesia microti* em hamsters foi destacado, revelando menor parasitemia durante a infecção aguda.

The immune system is formed of a network of specialized cells which by internal communications influence each other to maintain a status of immunological homeostasis. By its own nature the immunological system may be affected by internal or external stimuli which one way or another desequilibrate the delicate balance of immunological homeostasis. Some substances called immunomodulators have the ability to normalize the immune response and reestablish homeostasis when injected into an animal whose immune functions are not normal.

---

\* Presented at the section on research of the 1980 Annual Meeting of the American Veterinary Medical Association.

The immunomodulators to be reviewed in this article are some of the substances most used in monitoring the abnormal state of the immune network towards equilibrium.

1. *Bacillus Calmette Gérin (BCG)* — It is a viable attenuated strain of *Mycobacterium bovis* obtained by progressive reduction of virulence by culturing this bacteria in culture medium enriched with bovine bile.

BCG has received considerable attention as an immunomodulator in the last twenty years. Its major effect is seen as an increased resistance to transplantable tumors in rats (5) and inhibition of the induction of tumor formation by methylcholanthrene (22). Negative effects have been observed in the tumorbearing host, particularly when BCG was given after the tumor was well established (22). The tumor enhancement mechanism may involve the simulation of serum "blocking factors" or antigen-antibody complexes that antagonize the cell mediated immunoresponse to tumors. In fact, BCG has been found to have an effect on Ab production enhancing production of antibodies against T cell dependent antigens (1).

Although BCG has been shown to protect or reverse the immunosuppressive effect of methylcolanthrene and cytosine arabinose it may also have immunosuppressive effects at certain dose schedules due to stimulation of suppressor T cells or macrophages (3). BCG has a direct effect on macrophages increasing the random migration, chemotaxis and pinocytosis of macrophages of guinea pigs (23). Both carbon and bacterial clearance are accelerated by injection of BCG (15). In general, BCG activated macrophages are capable of recognizing and destroying neoplastic cells.

Macrophages in the afferent arm of the immune response are also influenced by BCG. These macrophages in presence of BCG produce a lymphocyte-activating factor which may be responsible for the mitogenic effect of BCG on T cells (10).

In summary, the immunomodulating activity of BCG is a result of the vectorial sum of its many effects on attraction, trapping and activation of lymphocytes and macrophages (25).

2. *Corynebacterium parvum* — Although *Corynebacterium parvum* is the accepted and widespread name utilized to describe the killed anaerobic bacteria used to alter the immunological functions of vertebrates the name is not taxonomically correct. Johnson & Cummings (19) determined that the so called *C. parvum* corresponds to the genus *Propionibacterium* and one of the following species *acnes I*, *acnes II*, *avidum* or *granulosum*. However, for the effect of this review *C. parvum* indicates only a preparation of one of a number of anaerobic coryneform bacteria with biologic activity.

One of the most visible consequences of *C. parvum* injection in mice is a hyperplasia of the spleen and liver, which may result in appearance of anemia with a transient decrease of lymphocyte count and monocytosis (24). The number of fixed macrophages, carbon clearance and other phagocytic functions of fixed macrophages are also enhanced by the injection of *C. parvum* (32).

Generally, treatment of animals with *C. parvum* can render them less susceptible to a variety of lethal infections (*Brucella abortus*, *Salmonella enteritidis*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium berghei*) (4) but under certain circumstances *C. parvum* may also decrease the host resistance and the production of interferon by macrophages (8).

Although *C. parvum* does not directly affect B lymphocytes it can augment the antibody response to a variety of T dependent and two T independent antigens (type 3 pneumococcal polysaccharide and dinitrophenol coupled with levan) (16). It seems that primary antibody responses are much more affected than secondary ones. However, the response to both types of antigens and to tumor-related antigens can be significantly suppressed by *C. parvum* under certain conditions.

It appears that whether *C. parvum* increases or decreases delayed type hypersensitivity (DTH) depends on when and how it is given. Administered systemically before sensitization *C. parvum* regularly suppresses DTH. The injection of *C. parvum* after sensitization enhances DTH response to tumors (4).

The immunomodulator effect of *C. parvum* is believed to be due to direct stimulation of macrophage functions like chemotaxis, maturation of macrophage precursors, lymphocyte trapping and cytotoxicity. In mice *C. parvum* suppresses T cell function under most experimental conditions. Apparently a population of macrophages actively suppress the responsiveness of T cells and probably B cells to mitogens and inhibit the maturation of T lymphocytes to cytotoxic cells.

Depending on the experimental conditions, the physiologic outcome of *C. parvum* injection may be resistance or susceptibility to infection, tumor inhibition or enhancement, adjuvanticity or immunosuppression.

3. *Interferon* — Interferon has been extensively studied as an antiviral substance since its discovery in 1957 by Issacs & Lindeman. Recent developments on the use of interferon in cancer treatment and the ability of interferon to inhibit cell division induced researchers to study the effect of interferon on the immunological system.

Interferon can inhibit antibody formation to thymus dependent (sheep erythrocytes) and thymus-independent antigens *in vitro* and *in vivo* (31). In this regard interferon Type I (produced by fibroblasts and leukocytes) is 10 to 100 times less suppressive than immune interferon or interferon Type II (produced by sensitized T lymphocytes) (6).

Both T and B cell *in vitro* mitogenic responses are suppressed by interferons. Although the same effect can be seen *in vivo* the immunosuppressive effect is not very potent.

Interferon seems to be the key immunoregulatory signal for natural killer (NK) cell activity and markedly increases the cytotoxic effect of the NK cells. NK cells are cytotoxic cells which do not have either T or B lymphocyte markers and are responsible for cellular cytotoxicity without prior sensitization. In these cells interferon could augment NK killer activity in two ways: it might activate existing NK cells or it could trigger the differentiation of a precursor to the NK cell into an effector cell (18).

Cyclic AMP plays a role in the regulation of interferon production by lymphocytes and suppression of the *in vitro* plaque forming cell response. Evidence has been found suggesting that dibutyryl CAMP inhibits the production of interferon in C57B1/6 mouse spleen cell cultures that were stimulated by two T cell mitogens (18).

The actual clinical activity of pure interferon as an immunomodulator has not been extensively studied due to the lack of enough quantities of interferon for this use. The production of interferon utilizing recombinant DNA technology will allow researchers to obtain significant quantities of interferon for this use.

4. *Levamisole* — Racemic tetramisole discovered in 1966 by Thienpont & col. (33) is a potent anthelmintic widely utilized in veterinary practice. Levamisole\*, the levorotatory isomer of tetramisole, is several times more potent but not more toxic than dexamisole, the dextrorotatory isomer and is the molecule preferred for use in human and veterinary medicine. Since the discovery of the immunomodulating activity of levamisole by Renoux & Renoux (27) many other publications have reviewed the theme (14, 28). For this reason the readers are referred to the recent reviews for detailed information.

5. *Thymopoietin* — Thymopoietin is a 49 amino acid polypeptide first isolated by Goldstein (12) during neuromuscular studies in relation to the human disease myasthenia

gravis (11). Although this hormone was first recognized by its actions on neuromuscular physiology it was quickly shown to have immunomodulating properties expressed as induced prothymocyte to thymocyte differentiation *in vitro* (2). The subsequent fractionation of thymus extracts and purification of thymopoietin resulted in the identification of a pentapeptide corresponding to residues 32-36 which was found to be the minimal fragment of thymopoietin with biologic activity (13).

The chemically synthesized active pentapeptide made of Arginyl-lysyl-aspartyl-valyl-tyrosine, known as TP<sub>5</sub> was shown to induce T cell and to inhibit B cell differentiation *in vitro* (30). It has been suggested that TP<sub>5</sub> have the same immune modulating properties as thymopoietin and probably affects the immune system by regulating the functional balance of the immune response\* (21).

Some studies on the immunoregulatory action of thymopoietin pentapeptide were done utilizing aging and autoimmunity as models of abnormal immune response. In aged mice the deficits of immune function could be recovered by reconstitution of the T cell population with T cells from young animals. Under certain conditions (34) TP<sub>5</sub> was shown to restore the immune responsiveness of aged mice to the youthful pattern, thus enhancing the immune response.

Autoantibodies to mouse red blood cells provoked by injecting the animals with cross reacting rat red blood cells were shown to be eliminated after intraperitoneal injections of TP<sub>5</sub>. No effect was observed on the immune response against extrinsic antigens of rat red blood cells (20).

The spontaneous immunopathologic reaction of New Zealand mice is characterized by thymic involution followed by loss of suppressor T cell function reduction of cell mediated immunity and polyclonal B cell activation. Treatment with thymopoietin pentapeptide was shown to stimulate suppressor T cell and mitogen responsiveness of lymph node lymphocytes, and to reduce the development of normal thymotoxic and anti-DNA antibodies in 4 week old New Zealand (NZ) mice (9).

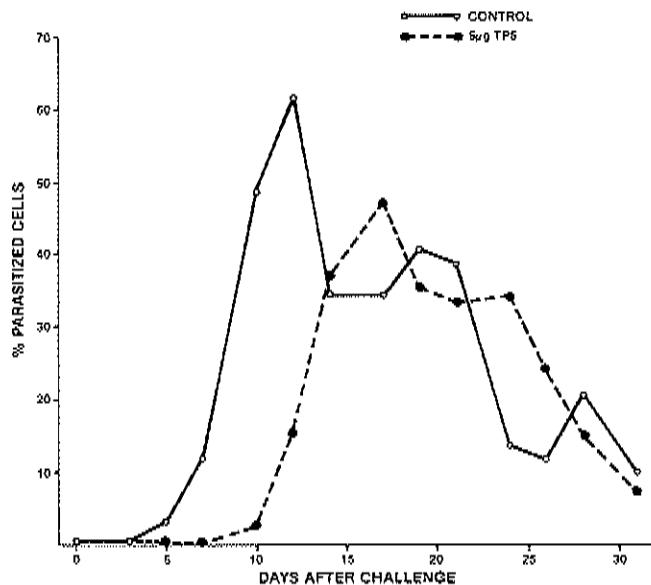
In our laboratory the immunomodulating effect of TP<sub>5</sub> is being studied utilizing a model system based on acute and chronic *Babesia microti* infections.

Some parasitic infections are known to depress cell mediated immune response of the host. For instance, *Plasmodium berghei*, a hemoparasite of rodents has been shown to have a marked immunosuppressive effect on cell mediated immune response in mice (17). Although the mechanism of protective immunity to *Babesia microti* has not been defined yet, the cellular immune response seems to be the most important one (26, 29) and a possible T helper activity was suggested (7). During acute infections by *B. microti*, intraperitoneal injections of TP<sub>5</sub> produced a marked delay in the initiation of a detectable parasitemia and a smaller degree of infection in animals treated as compared to placebo treated controls (Figure 1). It is possible that both the dose and the treatment schedules may not have been adequate enough to completely inhibit the development of the parasites. However, the results show that TP<sub>5</sub> is able to reactivate the cell mediated immunity depressed by the immunosuppressive activity of the parasite. If the effect of TP<sub>5</sub> was due to induction of differentiation of T cells, increasing the population of helper T cells or stimulating the cytotoxic activity of T lymphocytes or by some direct effect on macrophages or polymorphonuclear leukocytes is not clear yet.

These *in vivo* experiments re-emphasize the immunomodulating properties of thymopoietin pentapeptide (TP<sub>5</sub>) and suggest a mechanism of action directed towards regulating cells which control the state of the immune network and tend to restore it towards homeostasis. They also provide clues for a possible use of TP<sub>5</sub> in immunotherapy of parasitic and other immunological diseases in man and domestic animals.

\* Goldstein, G. & Lau, C.Y. — Thymopoietin and immunoregulation. Proceedings 12th Miles Symposium 1979. (in press).

**Figure 1 — Effect of TP<sub>5</sub> on acute *B. microti* infections in hamsters starting 3 days after infection, placebo and TP<sub>5</sub> groups were treated 3 times a week by IP infections. The parasitemia was measured in stained blood smears by calculating the percentage of parasitized cells in a thousand red blood cells**



It is clear that we are only beginning to scratch the surface of the field of immunomodulation. The complexity of the immune system and its relationship with interior and exterior regulators of the immune response complicate the understanding of it as a unit. But the advent of readily synthesized small defined molecules like levamisole and TP<sub>5</sub> and the increased availability of interferon offers new approaches to therapeutic manipulation of the immunological system of animals and men.

## References

- Allison, A.C. & Davies, A.J.S. — Requirement of thymus-dependent lymphocytes for potentiation by adjuvants of antibody formation. *Nature (London)*, 233:330-332, 1971.
- Basch, R.S. & Goldstein, G. — Induction of T cell differentiation *in vitro* by thymin, a purified polypeptide hormone of the thymus. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71:1474-1478, 1974.
- Bennett, J.A. & Mitchell, M.S. — Intravenous *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) induces splenic suppressor cells that inhibit *in vitro* immunization. *Proc. Am. Ass. Cancer Res.*, 19:22, 1978.
- Berd, D. — Effects of *Corynebacterium parvum* on immunity. *Pharmac. Therap. A.*, 2:373-395, 1978.
- Biozzi, G. & Stiffel, C. — Effect de l'inoculation dubacille de Calmette-Guerin sur le développement de la tumeur ascitique d'Ehrlich chez la souris. *D.R. Séanc Soc. Biol.*, 153:987-989, 1959.
- Bloom, B.R. — Interferons and the immune system. *Nature*, 284:593-595, 1980.
- Callon, L.L. — Vaccination against bovine babesiosis. In: — Miller, L.D.; Pino, J.A. & McKelvey, J.J., eds. — Immunity to blood parasites in animals and man. Plenum Press, 1977.
- Fischbach, J. & Glasgow, L.A. — Effect of *Corynebacterium acnes* on interferon production in mouse peritoneal exudate cells. *Infect. Immunity*, 11:80-85, 1975.
- Gershwin, M.E.; Kruse, W. & Goldstein, G. — The effect of thymopoietin and ubiquitin on spontaneous immunopathology of New Zealand mice. *J. Rheumatol.*, 6:10-20, 1979.
- Gery, I. & Waksman, B.H. — Potentiation of the T-cell response to mitogens. II — The cellular source of potentiating mediator(s). *J. Exp. Med.*, 136:143-155, 1972.
- Goldstein, G. — Thymitis and myastenia gravis. *Lancet*, 7:1164-1167, 1966.

12. Goldstein, G. — Isolation of a bovine thymin: a polypeptide hormone of the thymus. *Nature*, 247:11-14, 1974.
13. Goldstein, G.; Scheid, M.P.; Boyse, E.A.; Schesinger, D.H. & Van Vauwe, J. — A synthetic pentapeptide with biological activity characteristic of the thymic hormone thymopoietin. *Science*, 204:1309-1310, 1979.
14. Guerrero, J. — Parasite host interactions relative to levamisole. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 176:1163-1165, 1980.
15. Howard, J.C.; Biozzi, G.; Halpern, B.N.; Stiffel, C. & Mouton, D. — The effect of *Mycobacterium tuberculosis* (BCG) infection on the resistance of mice to bacterial endotoxic and *Salmonella enteritidis* infection. *Br. J. Exp. Pathol.*, 40:281-290, 1959.
16. Howard, J.C.; Christie, G.H. & Scott, M.T. — Biologic effects of *Corynebacterium parvum*. IV — Adjuvant and inhibitory activities on B lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 7:290-301, 1973.
17. Jayawardena, A.N.; Targett, G.A.; Leuchars, E.; Carter, R.L.; Doenhoff, M.J. & Davis A.J.S. — T cell activation in murine malaria. *Nature*, 258:149-151, 1975.
18. Johnson, H.M. & Baron, S. — Evaluation of effect of interferon and interferon inducers on the immune response. *Pharmac. Ther. A.*, 1:349-367, 1977.
19. Johnson, J.L. & Cummins, C.S. — Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, classical propionibacteria, and strains of *Arachnia propionica*. *J. Bacteriol.*, 109:1047-1065, 1972.
20. Lau, C.Y.; Freestone, J.A. & Goldstein, G. — The effect of thymopoietin pentapeptide (TP<sub>5</sub>) on autoimmunity. I — TP<sub>5</sub> suppression of induced erythrocyte autoantibodies in CH<sub>3</sub> mice. *J. Immunol.*, 125:1634-1638.
21. Lau, C.Y. & Goldstein, G. — Functional effects of thymopoietin (TP<sub>5</sub>) on cytotoxic lymphocyte precursor unit (CLP-U). I — Enhancement of splenic CLP-U *in vitro* and *in vivo* following suboptimal antigenic stimulation. *J. Immunol.*, 124:1861-1865, 1980.
22. Lavrin, D.H.; Rosenberg, S.A.; Connor, R.J. & Terry, W.D. — Immunoprophylaxis of methylcholanthrene induced tumors in mice with bacillus Calmette-Guerin and methanol-extracted residue. *Cancer Res.*, 33:472-477, 1973.
23. Meltzer, M.S.; Jones, E.E. & Boettcher, D.A. — Increased chemoattractive responses of macrophages from BCG-infected mice. *Cell. Immunol.*, 17:268-276, 1975.
24. Milas, L.; Basic, I.; Kogelnik, H.D. & Withers, H.R. — Effects of *Corynebacterium granulosum* on weight and histology of lymphoid organs, response to mitogens, skin allografts, and a synergic fibrocarcinoma in mice. *Cancer Res.*, 35:2365-2374, 1975.
25. Mitchell, M.S. & Murahata, R.I. — Modulation of Immunity by bacillus Calmette-Guerin (BCG). *Pharmac. Ther.*, 4:329-353, 1979.
26. Perez, M.; Carson, C.A. & Ristic M. — Cell-mediated immune response in hamsters infected with *Babesia microti*. *Vet. Parasitol.*, 3:161-167, 1977.
27. Renoux, G. & Renoux, M. — Effect immunostimulant d'un imidothiazole dans l'immunisation des souris contre l'infection par *Brucella abortus*. *C.R. Acad. Sci.*, 2720:349-350, 1971.
28. Renoux, G. — The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs*, 19:89-99, 1980.
29. Ruebush, M.J. & Hanson, W.L. — Transfer of immunity to *Babesia microti* of human origin using T lymphocytes in mice. *Cell. Immunol.*, 52:255-265, 1980.
30. Sheid, M.P.; Goldstein, G. & Boyse, E.A. — The generation and regulation of lymphocyte populations, evidence from differentiative systems *in vitro*. *J. Exp. Med.*, 147:1727-1743, 1978.
31. Sonnenfeld, G.; Mandel, A.D. & Merigan, T.C. — The immunosuppressive effect of type II mouse interferon preparations on antibody productions. *Cell. Immunol.*, 34:193-206, 1977.
32. Stiffel, C.; Mouton, D. & Biozzi, G. — Kinetics of the phagocytic function of reticuloendothelial macrophage *in vivo*. In: — van Furth, ed. — *Mononuclear phagocytes*. Oxford and Edinburgh, Blackwell Scientific Publications, pp. 335-381, 1970.
33. Thienpont, D.; Vanparijs, O.F.J.; Raemaekers, A.H.M.; Vandenkirk, J.; Demoen, P.J.A.; Allewijn, F.T.N.; Marsboom, R.P.H.; Niemegeers, C.N.E.; Schellekens, K.H.L. & Janssen, P.A.J. — Tetramisole (R 8299) a new potent broad spectrum anthelmintic. *Nature*, 209:1084-1086, 1966.
34. Weksler, M.E.; Innes, J.B. & Goldstein, G. — Immunological studies of aging. IV — The contribution of thymic involution to the immune deficiencies of aging mice and reversal with thymopoietin. *J. Exp. Med.*, 144:543-548, 1976.

# The effect of nystatin on spheroplasts of *Saccharomyces cerevisiae* containing different sterols incorporated into the plasma membrane

Maria Ligia Carvalhal Rosa  
& Flavio Alterthum

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

## Summary

Ergosterol or cholesterol enriched cells of *Saccharomyces cerevisiae* were treated with zymolyase 5.000, an enzyme that digest yeasts walls. The resulting spheroplasts were treated with nystatin and their lysis measured. Spheroplasts from aerobically grown cells had the same susceptibility to lysis by nystatin as compared with spheroplasts from cells grown in anaerobiosis, independently of the incorporated sterol. Since whole aerobically grown cells were much more sensitive to nystatin than those grown in anaerobiosis, it is conceivable that the cell wall may act as a barrier to the action of nystatin. Factors other than the kind of incorporated sterol seem to be implicated in the determination of the sensitivity of cells to nystatin, since *S. cerevisiae* containing ergosterol or cholesterol behaved similarly, in this system.

## Resumo

*Efeito da nistatina em esferoplastos de Saccharomyces cerevisiae contendo diferentes esteróis incorporados na membrana*

Células de *Saccharomyces cerevisiae* foram cultivadas em aerobiose e anaerobiose; nesta segunda condição, as células tiveram suas membranas enriquecidas com ergosterol ou colesterol. As células foram tratadas por Zimoliase 5.000, obtendo-se os respectivos esferoplastos e estes submetidos a ação da nistatina. Todos foram igualmente suscetíveis a ação lítica da nistatina, independentemente das condições prévias de cultivo e do esterol presente na membrana citoplasmática. Sendo as células íntegras cultivadas em aerobiose muito mais sensíveis à ação letal da nistatina do que aquelas cultivadas em anaerobiose, é provável que a parede celular interfira, de alguma forma, na ação deste antibiótico. Outros fatores, além do tipo de esterol, parecem estar implicados na sensibilidade à nistatina, uma vez que *S. cerevisiae* contendo ergosterol ou colesterol, comportaram-se similarmente, no sistema empregado.

## Introduction

Polyenic antibiotics inhibit growth of molds (e.g. *Penicillium* and *Aspergillus*), dermatophytes (e.g. *Epidermophyton*, *Microsporum* and *Trichophyton*), yeasts and dimorphic fungi (e.g. *Candida*, *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Cryptococcus* and *Coccidioides*) (12, 13,

16). The only polyenes which have been extensively used clinically are nystatin and amphotericin B (12). The selective toxicity of these compounds can be explained by their ability to interact with ergosterol, which predominates in the membrane of fungal cells, rather than with cholesterol which is characteristic of animal cells (10). To evaluate better the selectivity of this toxic effect we chose *Saccharomyces cerevisiae* as a model since, under aerobic conditions, it grows in a simple unsupplemented medium whereas under anaerobic conditions, it becomes auxotrophic for a sterol and an unsaturated fatty acid (3, 4). These growth factors are incorporated by the cells and become part of the cytoplasmic membrane (1, 7, 14, 22).

In a previous paper (18) one of us showed that aerobically grown *S. cerevisiae* is much more sensitive to nystatin than anaerobic cultures, regardless of whether the incorporated sterol is ergosterol or cholesterol. The present work aims at determining the possible role of the cell wall in the resistance to nystatin. Spheroplasts were obtained from *S. cerevisiae* cells and their sensitivity to the drug was tested. Other factors affecting sensitivity to nystatin were also studied such as the physiological stage of the cell and the effect of ions in the suspending medium of nystatin-treated spheroplasts.

## Material and Methods

**Organism** — The organism used was *S. cerevisiae* NCYC 366, a strain than can be easily converted into spheroplasts (1). This strain was maintained on malt agar and repleted weekly.

**Culture** — *S. cerevisiae* was cultured under aerobic and anaerobic conditions according to previously described method (18). For the anaerobic culture, ergosterol or cholesterol (Sigma) was added along with oleic acid (Sigma).

**Antibiotic** — Nystatin (powder) was kindly provided by Squibb Indústrias Químicas S/A, São Paulo, Brazil. Immediately before each experiment a solution of the drug was prepared by dissolving 10mg of nystatin in 0.5ml dimethylsulfoxide (BDH), the volume being completed to 10ml with sterilized distilled water. Appropriate dilutions of this solution (1mg/ml) were made.

**Spheroplasts** — Spheroplasts were obtained by the method described by Alterthum & Rose (1), except for the fact that the enzyme used was zymolyase 5.000 (Kirim Brewery) 0.1mg enzyme/2.0mg cells dry weight. Cells from different cultures were centrifuged at 3.015g for 15min at 4°C, and washed 3 times with a solution containing Tris (20mM) and MgCl<sub>2</sub> (10mM). A cell suspension was prepared in citrate-phosphate buffer (50mM, pH 7.0) containing MgCl<sub>2</sub> (10mM) and sorbitol (1.5M) (Buffer A). Cells were incubated with the enzyme and shaken at 30°C, on a rotatory shaker, 50rpm. Spheroplast formation was considered maximal when the absorbance of the cell suspension diluted with water was at least one fourth the initial value, and did not alter on at least two consecutive samples. The percentage of lysis of the spheroplasts was calculated by the following equation:

$$100 - \frac{\text{Abs}_{(600)} \text{ of the test suspension} \times 100}{\text{initial Abs}_{(600)}}$$

where Abs<sub>600</sub> is the absorbance at 600nm. The preparation was also examined under light microscope to confirm the results of the absorbance readings. The spheroplasts were separated by centrifugation at 1000g for 15min at 4°C.

The sediment was carefully resuspended in citrate-phosphate buffer (5mM, pH = 7.0) containing MgCl<sub>2</sub> (1mM) and sorbitol (1.5M). The suspension was standardized for

0.9 absorbance with a Bausch-Lomb spectrophotometer (600nm), using 10 × 85mm tubes. The spheroplast suspension (10ml) was distributed in Erlenmeyer flasks, and 0.1ml of the nystatin solution at the desired concentration was added to each flask. The spheroplast and antibiotic mixtures were incubated in a waterbath at 30°C. The effect of nystatin was determined by absorbance readings (600nm) at regular intervals. A duplicate tube was prepared for each concentration. All solutions used contained a mixture of chloramphenicol (Carlo Erba) and cycloheximide (Upjohn) at a final concentration of 100 µg/ml each, to avoid synthesis of new aerobically-induced enzymes.

## Results and Discussion

**Spheroplast formation** — Fig. 1 shows that cells in the logarithmic growth phase submitted to the action of zymolyase converted easily into spheroplasts, in 15 minutes. Spheroplasts were obtained from aerobic and anaerobic cultures, regardless of the kind of sterol incorporated. Cells from stationary phase cultures partially resisted spheroplast formation and this resistance was higher in the case of aerobically growing cells. (Fig. 2). Other investigators working with different microorganisms have detected differences in their susceptibility to the action of enzymes which degrade yeast cell walls. Such variations depended on the microbial strain and on the physiological stage of cells (6, 20).

Figure 1 — Formation of spheroplasts of *S. cerevisiae* at the logarithmic growth phase

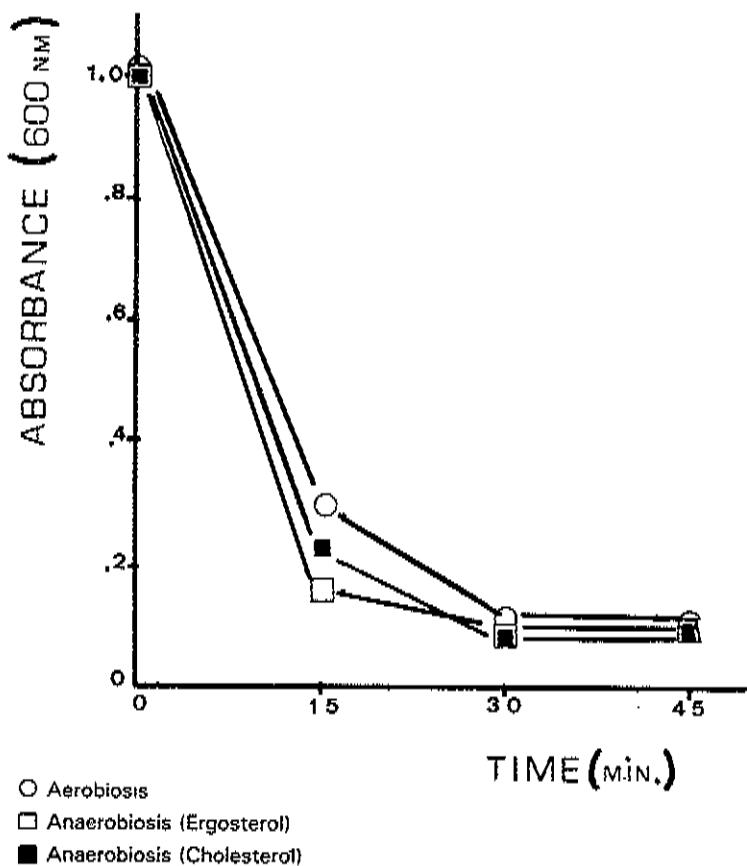
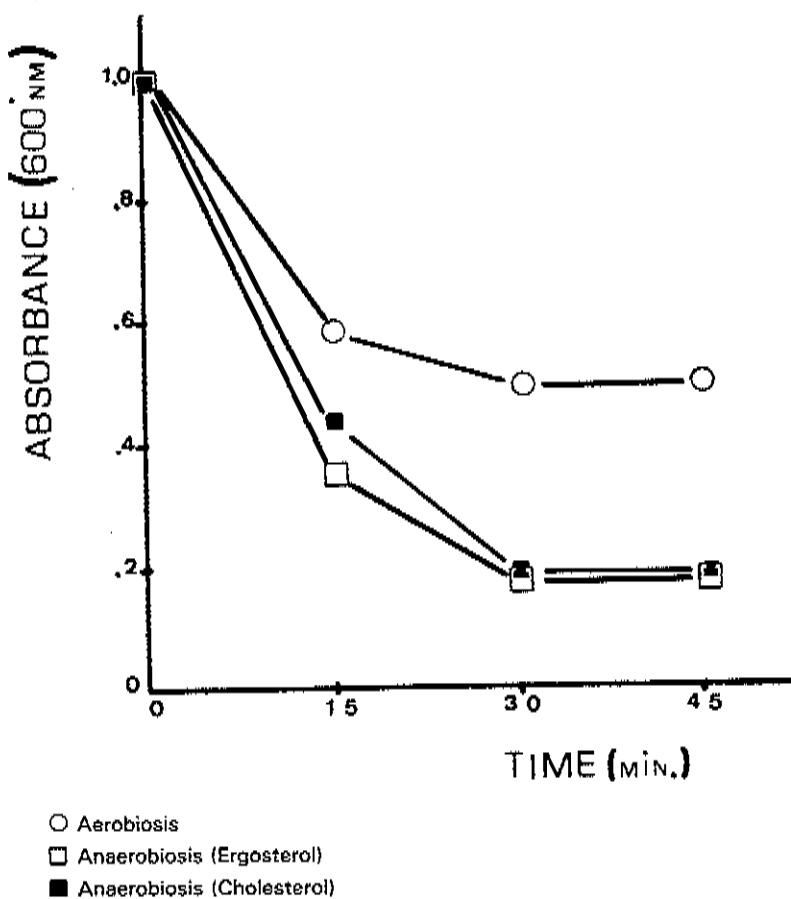
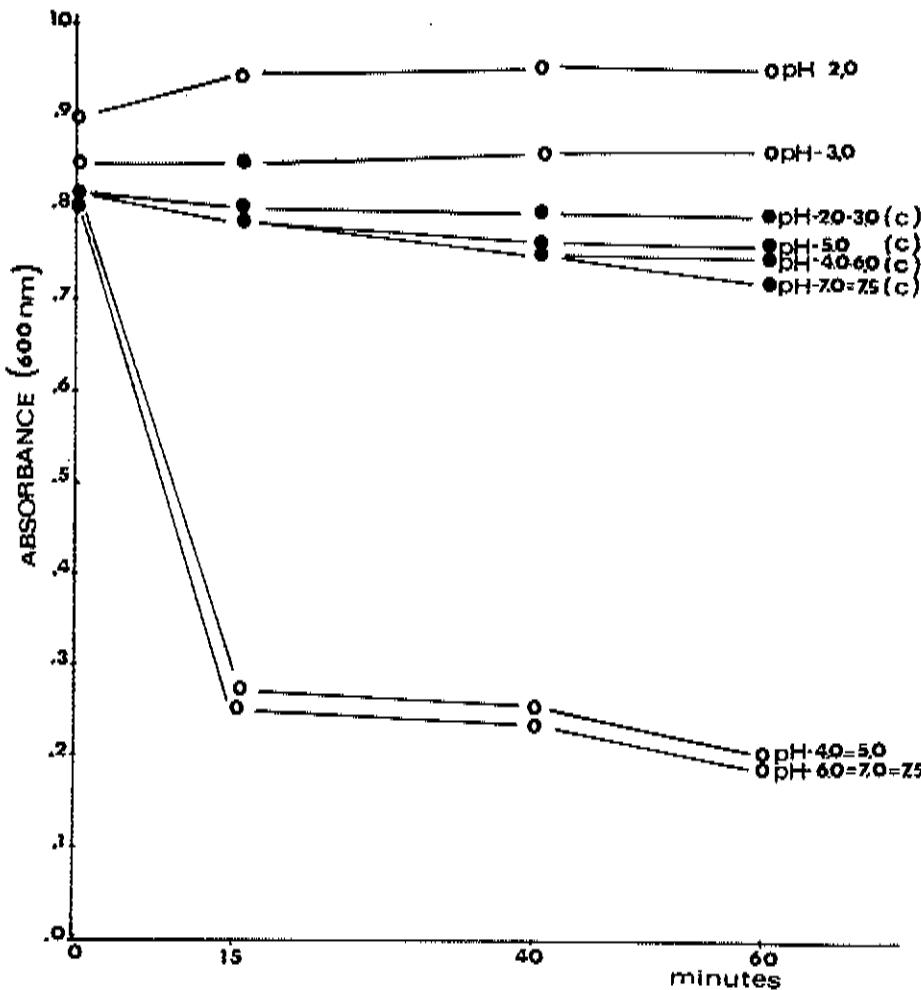


Figure 2 — Formation of spheroplasts of *S. cerevisiae* at the stationary growth phase



Deutch & Parry (9) pointed out the important role played by proteins in the cell wall, whose abundance of disulfide bonds, specially in cells at the stationary phase, may be responsible for the greater resistance of these cells to the action of helicase. Previous treatment with reducing agents did not increase cell sensitivity, a result basically different from those obtained by Anderson & Millbank (2). The latter authors submitted yeasts to the same treatment and obtained increased cell sensitivity to helicase. Alterations in culture conditions such as the growth rate and substrate concentration were shown to cause changes in the chemical composition of cell walls in yeasts. McMurrough & Rose (17) and Alterthum & Rose (1) while obtaining spheroplasts from *S. cerevisiae* with  $\beta$ ,1-3 glucanase, pointed out the influence of the chemical composition of the membrane on the activity of enzymes responsible for the synthesis of the cell wall polymers (glucan, mannan and proteins).

**Action of nystatin on spheroplasts — Effect of buffer pH and molarity** — The role played by H ion concentration on the lytic activity of nystatin on spheroplasts was studied. At pH values less than 4.0 there was practically no activity of nystatin in comparison with values obtained at higher pH (Fig. 3). With buffers at pH 2.0 and 3.0, there was a small increase in the absorbance of the suspension in presence of nystatin (Fig. 3). Light microscopy showed that in these conditions spheroplasts appeared to be altered, with increased size,

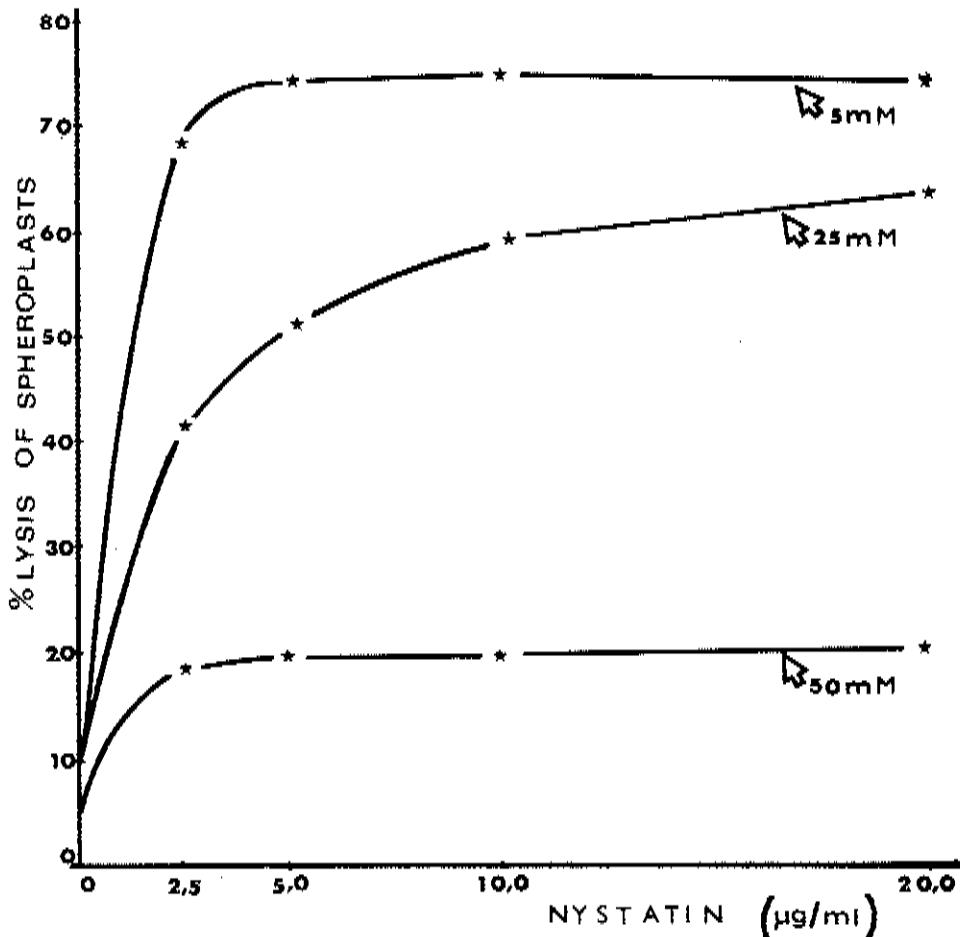
Figure 3 — The effect of pH on the activity of nystatin on spheroplasts of *S. cerevisiae*

(c) = Spheroplasts suspended without nystatin.

and with clearer and more sharply defined internal regions. This phenomenon was also observed and discussed by Arnold & col. (5) in their study on the effect of amphotericin B on the ultrastructure of *Histoplasma capsulatum*. They measured the size of the vacuoles in treated and untreated cells and concluded that the cell vacuoles, by acting as a "space buffer", play an important role in the survival of cells under stress. Polyenes cause a loss of intracellular ions, decrease in cytoplasmic osmolarity, and consequent osmotic imbalance between the cytoplasm and the vacuole. The water flow towards the interior of the vacuole could explain the changes observed in the size of the organelle.

Another hypothesis which may explain our results is that, with the outflow of K<sup>+</sup> ions due to nystatin-induced altered cell permeability a concomitant inflow of H ions may occur. The acidification of the internal medium may cause the precipitation of intracellular components which may explain in part the increased absorbance of spheroplasts treated with nystatin at pH 2.0 and 3.0. The effect of buffer molarity on the action of nystatin parallels the pH effect, since both involve a variation of ion concentration in the medium (Fig. 4).

Figure 4 — The effect of buffer osmolarity on the activity of nystatin. Percentage of spheroplast lysis after 30 minutes in contact with nystatin



*Nystatin-induced spheroplast lysis* — Spheroplasts sensitivity to lysis by nystatin was practically the same regardless the culture conditions of the original cells (Tables 1, 2 and 3). Differences observed between cultures at the logarithmic growth phase and at the sta-

Table 1 — The effect of nystatin on spheroplasts of *S. cerevisiae* grown in aerobiosis (logarithmic phase). Percentage of lysis after 15 minutes with nystatin

Nystatin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lysis of spheroplasts (%)*
20	74,6 $\pm$ 1,08 (5)
10	74,6 $\pm$ 0,74 (5)
5	68,0 $\pm$ 5,41 (5)
2,5	57,2 $\pm$ 7,98 (5)
1,25	49,2 $\pm$ 12,8 (5)
0	1,9 $\pm$ 0,98 (5)

\* Mean percentage of lysis  $\pm$  95% confidence limits. Values in parenthesis represent the number of determinations.

**Table 2** — The effect of nystatin on spheroplasts of *S. cerevisiae* grown in anaerobiosis in a medium supplemented with ergosterol (logarithmic and stationary phase). Percentage of lysis after 15 minutes with nystatin

Nystatin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lysis of spheroplasts (%) <sup>*</sup>	
	Logarithmic phase	Stationary phase
20	66,4 ± 8,71 (5)	71,4 ± 8,3 (5)
10	63,6 ± 7,81 (5)	64,8 ± 9,01 (5)
5	60,0 ± 10,12 (5)	57,4 ± 7,1 (5)
2,5	55,6 ± 10,6 (5)	51,6 ± 12,3 (5)
1,25	53,0 ± 8,8 (5)	24,2 ± 3,8 (5)
0	2,0 ± 0,77 (5)	4,4 ± 1,73 (5)

\* Mean percentage of lysis ± 95% confidence limits. Values in parenthesis represent the number of determinations.

**Table 3** — The effect of nystatin on spheroplasts of *S. cerevisiae* grown in anaerobiosis in medium with cholesterol (logarithmic and stationary phase). Percentage of lysis after 15 minutes with nystatin

Nystatin ( $\mu\text{g/ml}$ )	Lysis of spheroplasts (%) <sup>*</sup>	
	Logarithmic phase	Stationary phase
20	67,8 ± 10,65 (5)	70,25 ± 8,25 (4)
10	65,2 ± 11,49 (5)	66,0 ± 10,1 (4)
5	58,4 ± 10,81 (5)	62,0 ± 9,09 (4)
2,5	54,4 ± 9,71 (5)	58,5 ± 13,58 (4)
1,25	41,0 ± 6,96 (5)	38,0 ± 15,3 (4)
0	2,2 ± 1,03 (5)	2,2 ± 1,77 (4)

\* Mean percentage of lysis ± 95% confidence limits. Values in parenthesis represent the number of determinations.

tionary growth phase were not significant. Upon measuring the sensitivity of *S. cerevisiae* cells to nystatin by counting the number of colony-forming units on solid medium we showed that the sensitivity of cells from anaerobic cultures containing ergosterol or cholesterol was considerably lower than that of cells cultured under aerobic conditions (18). By comparing these results with those with spheroplasts in the presence of nystatin, we conclude that walls of cells cultured anaerobically possibly act as a barrier against the action of nystatin. In fact, once the walls of anaerobic cells containing ergosterol were eliminated, the resulting spheroplasts behaved in the same way as nystatin-treated aerobic cells. Apparently, cholesterol-containing membranes display the same ability to interact with the antibiotic as ergosterol-containing ones. This result casts doubts on data on the selective toxicity of polyenic antibiotics which act on fungi but not on the host cell which contains cholesterol as the major sterol in the membrane (10, 11, 23).

Hsu-Chen & Feingold (15) worked with human erythrocytes and with *Acholeplasma laidlawii* previously cultured with different steroids which were incorporated into the membranes. Erythrocytes and the mycoplasma resisted more to polyenes when their membranes contained cholesterol than when they contained ergosterol. The results obtained with erythrocytes and with *A. laidlawii* differ considerably from ours with *S. cerevisiae* spheroplasts. This led us to believe, as did other authors (8, 19, 21), that the action of polyenes depends on the structure of the sterol present in the membrane, the phospholipid-sterol ratio and the more or less orderly state of the membrane. Such state is affected by the composition of saturated and unsaturated fatty acids in the phospholipids and triglycerides which provide different levels of fluidity to the cytoplasmic membrane

(22). The results obtained with spheroplasts with membranes containing either ergosterol or cholesterol indicate that further studies on the action of nystatin and polyenes in general, are needed.

## References

1. Alterthum, F. & Rose, A.H. — Osmotic lysis of spheroplasts from *Saccharomyces cerevisiae* grown anaerobically in media containing different unsaturated fatty acids. *J. gen. Microbiol.*, 77:371-382, 1973.
2. Anderson, F.B. & Millbank, J.W. — Protoplast formation and yeast cell wall structure: the action of the enzymes of the snail *Helix pomatia*. *Biochem. J.*, 99:682-687, 1966.
3. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I — Ergosterol requirement for growth in a defined medium. *J. cell comp. Physiol.*, 41:23-36, 1953.
4. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. — Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II — Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. *J. cell comp. Physiol.*, 43:271-281, 1954.
5. Arnold, W.N.; Pringle, A.T. & Garrison, R.G. — Amphotericin B induced changes in K<sup>+</sup> content, viability and ultrastructure of yeast-phase *Histoplasma capsulatum*. *J. Bact.*, 141:350-358, 1980.
6. Brown, J.P. — Sensitivity of the cell walls of some yeasts to lysis by enzymes of *Helix pomatia*. *Canad. J. Microbiol.*, 17:205-208, 1971.
7. Carvalhal, M.L.C.; Castellani, B.R. & Alterthum, F. — Efeito de antibióticos poliênicos sobre *Saccharomyces cerevisiae* contendo diferentes esteróis e ácidos graxos insaturados incorporados a membrana citoplasmática. *Rev. Microbiol.*, 11:71-75, 1980.
8. Demel, R.A.; Crombag, F.J.L.; Van Deenen, L.L.M. & Kinsky, S.C. — Interaction of polyene antibiotics with single and mixed lipid monomolecular layers. *Biochim. biophys. Acta*, 150:1-14, 1968.
9. Deutch, C.E. & Parry, J.M. — Sphaeroplasts formation in yeasts during the transition from exponential phase to stationary phase. *J. gen. Microbiol.*, 80:259-268, 1974.
10. Gale, E.F. — Perspectives in chemotherapy. *Brit. med. J.*, 4:33-38, 1973.
11. Gale, E.F. — The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *J. gen. Microbiol.*, 80:451-465, 1974.
12. Hoeprich, P.D. — Chemotherapy of systemic fungal diseases. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 18:205-231, 1978.
13. Holz, R.W. — Polyene antibiotics: nystatin, amphotericin B and filipin. In: — Hahn, F.E., ed. — *Antibiotics*. Springer-Verlag, vol. 2, p. 313 — 340, 1979.
14. Hossack, J.A. & Rose, A.H. — Fragility of plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae* enriched with different sterols. *J. Bact.*, 127:67-75, 1976.
15. Msuchen, C. & Feingold, D.S. — Selective membrane toxicity of the polyene antibiotics: studies on natural membranes. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4:316-319, 1973.
16. Kobayashi, G.S. & Medoff, G. — Antifungal agents: recent developments. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31:291-308, 1977.
17. McMurrough, I. & Rose, A.H. — Effect of growth rate and substrate limitation on the composition and structure of cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, 105:189-203, 1967.
18. Rosa, M.L.C. — Estudo da sensibilidade de células de *Saccharomyces cerevisiae* a ação da nistatina. São Paulo, Instituto de Química U.S.P., 1979. (Tese de Doutoramento).
19. Sessa, G. & Weissmann, G. — Effects of four components of the polyene antibiotic filipin, on phospholipid spherules (liposomes) and erythrocytes. *J. biol. Chem.*, 243:4364-4371, 1968.
20. Shahin, M.M. — Relationship between yield of protoplasts and growth phase in *Saccharomyces*. *J. Bact.*, 110:767-771, 1972.
21. Van Zutphen, H.; Demel, R.A.; Norman, A.W. & Van Deenen, L.L.M. — The action of polyene antibiotics on lipid bilayer membranes in the presence of several cations and anions. *Biochim. biophys. Acta*, 241:310-330, 1971.
22. Watson, K. & Rose, A.H. — Fatty acyl composition of the lipids of *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically in media containing different fatty acids. *J. gen. Microbiol.*, 117:225-233, 1980.
23. Zygmunt, W.A. & Tavormina, P.A. — Steroid interference with antifungal activity of polyene antibiotics. *Appl. Microbiol.*, 14:865-869, 1966.

**Simple and inexpensive  
method for culturing  
*Campylobacter fetus*  
subsp. *jejuni***

Marcelo Magalhães

Marlene de Araújo Andrade

*Centro de Microbiologia e Imunologia,  
Rua 7 de Setembro, 508  
50000 Recife PE, Brasil*

& Gisélia Pontes da Silva

*Instituto Materno Infantil de Pernambuco, Largo dos Coelhos  
50000 Recife PE, Brasil*

### **Summary**

A simple system which utilizes steel wool, cupric sulphate, and Alka-Seltzer was compared with the GasPak system for recovering *Campylobacter fetus subsp. jejuni* from stools. Both methods were equally efficient, but the steel wool method is less expensive.

### **Resumo**

*Método simples e econômico para cultivar Campylobacter fetus subsp. jejuni*

Método simples que utiliza lã de aço, sulfato de cobre e Alka-Seltzer foi comparado com o sistema GasPak no isolamento de *Campylobacter fetus subsp. jejuni* das fezes. Ambos métodos foram igualmente eficazes, porém o de lã de aço é muito menos dispendioso.

Over the last few years *Campylobacter fetus subsp. jejuni* has been recognized as a major cause of bacterial enteritis in humans (Skirrow, M.B., Br. Med. J., 32:89-94, 1979; Karmali, M.A. & Fleming, P.C., J. Pediatr., 94:527-533, 1979; Svedhem, A. & Kaijser, B., J. Infect. Dis., 142:353-359, 1980). Consequently, the inclusion of appropriate methods to isolate the organism is mandatory in clinical microbiology laboratories. Since *C. jejuni* is a strict microaerophile and requires carbon dioxide to grow (Smibert, R.M., Annu. Rev. Microbiol., 32:673-709, 1978), many special culture devices to achieve an adequate atmosphere have been proposed (Karmali, M.A. & Fleming, P.C., J. Clin. Microbiol., 10:245-247, 1979; Kaplan, R.L.; Kwiatkowski, J.E. & Landau, W., Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., C227, p. 312, 1980; Blaser, M.J.; Glass, R.I.; Huq, M.I.; Stoll, B.; Kibriya, G.M. & Alim, A.R.M.A., J. Clin. Microbiol., 12:744-747, 1980; Kaplan, R.L.; Barrett, J.E. & Landau, W., Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., C201, p. 296, 1981). In the present study the ability of the combination of copper sulphate, steel wool, and Alka-Seltzer, a simple and inexpensive system, which has formerly been indicated to transport

clinical specimens for anaerobic culturing, is evaluated for routine isolation of *C. jejuni* from human stools.

The steel wool method was described with details elsewhere (Attebery, H.R. & Finegold, S.M., Am. J. Clin. Path., 53:383-388, 1970). Briefly, pads of kitchen steel wool 4-5g in weight are pressed down in a Petrie dish containing 10ml of an acidified copper sulphate solution (cupric sulphate 5g; distilled water 100ml; concentrated sulfuric acid 0.33ml; tween 80 0.2ml). The steel wool is shaken, the liquid is poured off, and the dish is inverted on the bottom of a kitchen glass container (1500ml of capacity) provided with a screw-on plastic lid. Inoculated plates are introduced into the container and a half of a tablet of Alka-Seltzer (1.8g) is attached to the inner wall with a tape. During incubation oxygen is depleted and the water vapor formed acts on the Alka-Seltzer to liberate carbon dioxide. Using the substances in the proportion above a true anaerobiosis is not attained as it is in the original method, but only a reduced oxygen environment rich in carbon dioxide.

To evaluate the efficacy of the steel wool method in routine isolation of *C. jejuni* it was compared with the current system used in this laboratory, which utilizes the GasPak hydrogen + carbon dioxide generator envelope (BBL) introduced in an anaerobic jar (BBL) with the palladium catalyst removed. A total of 80 diarrheal stools, received from an equal number of infants under two years of age, were studied. Duplicate Brucella agar plates enriched with 10% of sheep blood and the following antimicrobial concentrations per liter: vancomycin 10mg; trimethoprim 5mg; amphotericin 2mg; cephalothin 15mg; and colistin 40 000IU were seeded and incubated at 42°C for 48h, one in GasPak and the other in the steel wool container. Colonies morphologically resembling *C. jejuni* were selected, subcultured, and identified by the methods outlined elsewhere (Kaplan, R.L., In:—Lennette, E.H.; Balows, A.; Hanoler Jr., W.J. & Truant, J.P., eds.—Manual of Clinical Microbiology. 3ed. American Society for Microbiology, p. 235-241, 1980).

Of 80 fecal specimens cultured 15 (18.5%) yielded *C. jejuni* on both systems. Therefore, the steel wool method provides an appropriate atmosphere for recovering *C. jejuni* from stools at least as efficiently as that achieved in GasPak. However, the inexpensive steel wool method may prove to be more reliable for use in clinical laboratories situated in developing countries.

## **Incapacidade do $\beta$ -caroteno de proteger *Escherichia coli* J-5 da ação letal da luz ultra violeta\***

Geraldo A.S. Passos Jr.

*Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas UNESP  
Campus Universitário  
15100 São José do Rio Preto SP, Brasil*

& Tânia M.A. Domingues Zucchi

*Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto USP  
Campus de Ribeirão Preto  
14100 Ribeirão Preto SP, Brasil*

### **Resumo**

A sobrevivência à luz ultra violeta, de uma população de células de *Escherichia coli* linhagem J-5, não foi modificada quando estas foram tratadas com beta-caroteno. Foi verificado que este carotenóide não confere radioproteção aos efeitos letais da luz u.v., nesta linhagem bacteriana.

### **Summary**

*Inc capacity of  $\beta$ -carotene to protect *Escherichia coli* J-5 against ultra violet light lethal action*

The ultra violet light survival of *Escherichia coli* J-5 cell population was not modified when it was  $\beta$ -carotene treated. It was found that this carotenoid does not confer radioprotection to the u.v. light effects in this bacterial strain.

### **Introdução**

Alguns trabalhos têm enfatizado os efeitos do beta-caroteno, como agente fotoprotetor em sistemas eucarióticos (2, 9, 11, 12, 13), bem como o papel dos carotenóides em geral, na proteção contra danos foto-induzidos em bactérias (7, 8).

Acredita-se que o beta-caroteno atue ao nível de extinção do oxigênio simples, gerado numa reação fotoquímica (3, 4), ou como um filtro ao comprimento de onda da luz responsável pela ação fotodinâmica (9).

Geralmente, correlaciona-se ausência de moléculas de pigmentos celulares, com a freqüência de danos causados por luzes ou radiações ionizantes em microrganismos (1, 5, 8).

---

\* Trabalho realizado no Setor de Genética de Microrganismos do Deptº de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP.

Este trabalho tem como finalidade verificar se o beta-caroteno não sintetizado por *Escherichia coli* J-5, mas adicionado às culturas e/ou a uma suspensão em meio M 63/20 (6) desta bactéria, pode protegê-la contra os efeitos letais da luz ultra violeta, ao nível de sobrevivência.

## Material e Métodos

a. *Bactéria* — *Escherichia coli* linhagem J-5, mutante *pro* e *met* foi proveniente do Instituto de Genética de Piracicaba da ESALQ/USP.

b. *Beta caroteno* — “Beta-caroteno — Sigma” foi utilizado em solução de metanol P.A. Carlo Erba, conservada a 4°C.

c. *Meios de cultura* — Meio líquido para culturas exponenciais composto de Bacto-Tryptone Difco 1,5% e NaCl P.A. Merck 0,5% e meio sólido de mesma composição acrescido de Bacto-Agar Difco 1,5%. Ambos foram esterilizados em autoclave a 120°C por 15-20 minutos.

d. *Solução para suspensão e diluições da bactéria* — Meio mínimo para *E. coli* (M 63/20), segundo Jacob & Wollman 1961 (6), cuja composição é KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,8g; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,1g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0g; Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 0,01g e FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0,0005g completando o volume com água destilada para 1000ml. O pH é ajustado a 7,0 com KOH 20%. Para as suspensões e diluições da *E. coli* J-5 foram utilizadas diluições de 20 vezes deste meio.

A esterilização foi por autoclavagem a 120°C, por 15-20 minutos.

e. *Curva de sobrevivência à luz ultra violeta* — Vinte mililitros de uma cultura em fase exponencial de crescimento, com título igual a  $2,6 \pm 0,94 \cdot 10^8$ /ml, com duas horas de incubação a 37°C e agitação/aeração constante (inóculo; em torno de 6.  $10^8$  células, com densidade óptica a 550nm igual a 0,5), foram centrifugados a 1085 × g por 15 minutos, em centrifuga Sowall-Superspeed rotor tipo SS-1, cuja temperatura não excedeu a 25°C.

O precipitado de células bacterianas foi então ressuspenso, em 20ml de meio M 63/20 (6) e colocado em placa de Petri 100 × 15mm.

Esta placa permaneceu aberta sob uma lâmpada de raios ultra violeta (Germicidal Lamp GE g 15 t 8, 254nm a 64cm da placa verticalmente), em tempos de exposição, 0, 40, 80, 120, 160, 180 e 200 segundos.

A cada dose, uma aliquote de 0,1ml era retirada para diluições em meio M 63/20 (6) e posterior semeadura em meio triptone sólido.

As placas foram incubadas a 37°C por 16-18 horas e determinados os títulos para cada dose de luz u.v.. Estes títulos foram transformados em porcentagens relativas de sobrevivência em função dos tempos de exposição à luz ultra violeta.

f. *Testes de radioproteção* — Os testes de radioproteção tiveram como base a sobrevivência da bactéria, à luz u.v., tratada com beta-caroteno.

Para tanto, estabeleceu-se de início, relações de porcentagens relativas de sobrevivência a 30 segundos de luz ultravioleta, frente a diferentes concentrações de beta-caroteno que foram 0, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/ml de suspensão da bactéria em meio M 63/20 e o contato do beta-caroteno, com as células, foi durante a irradiação. Respectivamente, as concentrações do solvente metanol foram de 0, 0,008, 0,02, 0,04, 0,06 e 0,08ml/ml de meio, valores com os quais testamos, para um possível efeito desse solvente, na viabilidade das culturas bacterianas, verificando as densidades ópticas a 550nm e os títulos com relação a um controle.

Construiram-se também curvas de sobrevivência aos tempos de exposição, descritos no "item e", para três experimentos, fixando a concentração de 100  $\mu\text{g}$  de beta-caroteno/ml e variou-se o momento de contato do carotenóide com as células bacterianas.

No experimento A, o beta-caroteno teve contato com as células antes da irradiação. Estas cresceram com o beta-caroteno, adicionado ao meio de cultura exponencial, sendo posteriormente lavadas três vezes, por centrifugação e ressuspensão em meio M 63/20 (6).

No experimento B, o contato do carotenóide com as células foi durante a irradiação, adicionando-o à suspensão da bactéria em meio M 63/20; e no experimento C o beta-caroteno só teve contato depois da irradiação, sendo adicionado no meio sólido de semeadura.

Uma curva de sobrevivência com células bacterianas sem qualquer contato com o beta-caroteno serviu de controle.

Cada ponto destas curvas representa a média aritmética de três repetições.

## Resultados e Discussão

a. *Testes de viabilidade da E. coli J-5 com metanol e beta-caroteno* — culturas exponenciais da bactéria, desenvolvidas na presença de diferentes concentrações de solução metanólica de beta-caroteno, não apresentaram mudanças marcantes que indicassem inibição no crescimento, como demonstra a Tabela 1.

Tabela 1 — Teste de viabilidade da *E.coli* J-5 com metanol e  $\beta$ -caroteno

$\mu\text{l}$ de metanol por ml de meio de cultura	$\mu\text{g}$ de $\beta$ -caroteno por ml de meio de cultura	Título ( $\times 10^8$ )	Densidade óptica a 550nm
0	0	2,55	0,15
0,008	10	2,62	0,15
0,020	25	2,61	0,15
0,040	50	2,60	0,15
0,060	75	2,58	0,15
0,080	100	2,60	0,15

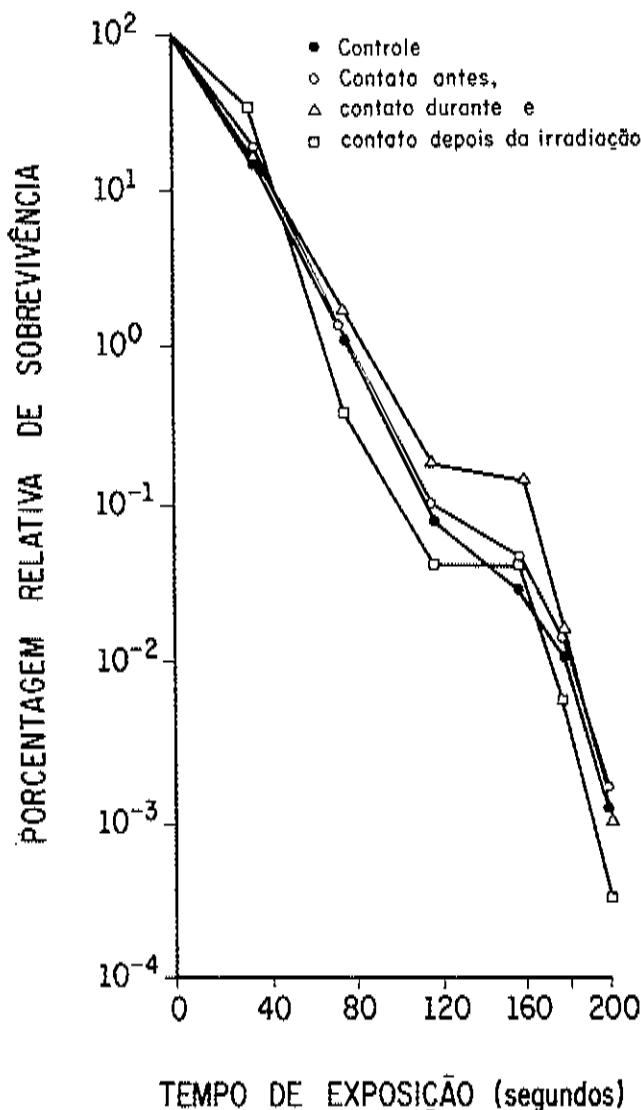
b. *Relação concentração-efeito na sobrevivência à u.v.* — a Tabela 2 mostra que não houve aumento na sobrevivência da bactéria, com a variação da concentração de beta-caroteno.

Tabela 2 — Títulos da relação concentração-efeito do  $\beta$ -caroteno a 30 segundos de u.v.

$\mu\text{g}$ de $\beta$ -caroteno por ml de meio de cultura	Título ( $\times 10^7$ )	Porcentagem de sobrevivência
0	1,04	3,7
10	1,82	7,0
25	2,18	8,4
50	1,76	6,8
75	1,45	5,6
100	1,82	7,0

c. *Variações no momento de contato (Figura 1)* — Com o intuito de verificar o nível de ação, na radioproteção pelo beta-caroteno, fez-se aquelas variações.

Figura 1 — Curvas de sobrevivência da *E.coli* J-5 à luz ultra-violeta e controle dos experimentos A, B, e C com  $\beta$ -caroteno



Assim, as células que tiveram contato com o carotenóide, antes da irradiação (experimento A), poderiam incorporar ou até metabolizá-lo, e o produto destas reações poderia protegê-las da luz ultra-violeta.

Contudo, os dados revelaram uma sobrevivência com valores estatisticamente iguais ao controle.

Irradiando-se as células na presença do beta-caroteno (experimento B), este poderia atuar como um filtro à luz u.v., acabando por protegê-las. Outra vez, obteve-se uma curva análoga ao controle.

Finalmente, supondo que o beta-caroteno pudesse agir ao nível de reparo sobre os danos causados pela luz u.v., foi adicionado às células da *E. coli* J-5 imediatamente após a irradiação (experimento C).

Entretanto, esta hipótese também foi abandonada, visto que outra curva análoga ao controle foi obtida.

Os valores das porcentagens relativas de sobrevivência dos experimentos foram comparados aos do controle, pelo teste estatístico de Wilcoxon & Wilcox,  $\alpha = 0.05$  (14).

Presume-se que as moléculas de beta-caroteno não foram incorporadas e/ou metabolizadas pelas células de *Escherichia coli* J-5, não conferindo assim efeito radioprotetor e não desempenharam papel de simples filtro aos raios ultra violeta, absorvendo-os e diminuindo a fotoenergia letal às células de maneira análoga à proteção da ação fotodinâmica (9).

Estes resultados são um reforço à sugestão da existência de especificidade quanto à radioproteção pelo beta-caroteno (e carotenóides em geral), pois também já foi observada a inabilidade de carotenóides de *Micrococcus* sp. proteger contra os efeitos da radiação ionizante e luz ultra violeta (10).

## Agradecimentos

Aos senhores Dr. M.V.F. Lemos, Dr. J.O. Machado, Prof.<sup>a</sup> M.J.S. Ornastroni, Dr. J.L. Azevedo, Dr. E.C. Souza, Dr.<sup>a</sup> N.M.M. Rossi, Dr. H. Terenzi e Prof. G. Mucillo pelo estímulo e orientações e à Sr.<sup>a</sup> S.R.S. Motta pela assistência técnica.

## Referências Bibliográficas

1. Bartlett, W.; O'Donovan, G.A. & Neef, R.D. — Effect of gamma radiation on *Serratia marcescens*: studies on radiosensitivity of prodigiosin production. *Rad. Res.*, 43:196-203, 1970.
2. Fritsch, P.; Gschnait, G.; Höningmann, H. & Wolff, K. — Protective action of  $\beta$ -carotene against lethal photosensitization of fibroblasts *in vitro*. *British J. Dermatol.*, 94:263-271, 1976.
3. Foote, C.S.; Chang, Y.C. & Denny, R.W. — Chemistry of singlet excited oxygen. X — carotenoid quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc.*, 92:5216, 1970.
4. Foote, C.S.; Chang, Y.C. & Denny, R.W. — Chemistry of singlet excited oxygen. XI — cis-trans isomerization of carotenoids by singlet excited oxygen and a probable quenching mechanism. *J. Am. Chem. Soc.*, 92:5218, 1970.
5. Hexcox, M.A. & Calberg, D.M. — Photoreactivation in *Halo bacterium cutirubrum*. *Can. J. Microbiol.*, 18:981-985, 1972.
6. Jacob, F. & Wollman, E.L. — Sexuality and the genetics of bacteria. New York, Academic Press, 1961.
7. Lewis, N.F.; Alur, M.D. & Kunta, U.S. — Role of carotenoid pigments in radio-resistant micrococci. *Can. J. Microbiol.*, 20:455-459, 1974.
8. Mathews, M.M. & Sistroim, W.R. — The function of carotenoid pigments of *Sarcina lutea*. *Arch. für Mikrobiol.*, 35:139, 1960.
9. Mathews, M.M. — Protective effect of  $\beta$ -carotene against lethal photosensitization by haematoporphyrin. *Nature*, 203:1092, 1964.
10. Mathews, M.M. & Krinsky, N.I. — The relationship between carotenoid pigments and resistance to radiation in nonphotosynthetic bacteria. *Photochem. Photobiol.*, 4:813-817, 1965.
11. Mathews-Roth, M.M.; Pathak, M.A.; Parrish, J.; Fitzpatrick, T.B.; Kass, E.H.; Toda, K. & Clemens, W. — A clinical trial of the effects of oral beta-carotene on the responses of human skin to solar radiation. *J. Invest. Dermatol.*, 59:340-353, 1972.
12. Mathews-Roth, M.M.; Pathak, M.A.; Fitzpatrick, T.N.; Harber, H.C. & Kass, E.H. —  $\beta$ -carotene as an oral photoprotective agent in erythropoietic protoporphyria. *J. Am. Med. Assoc.*, 228:1004-1008, 1974.
13. Oxford, G.S.; Pooler, J.P. & Narahashi, T. — Internal and external application of photodinamic sensitizers on squid giant axons. *J. Membr. Biol.*, 36:159-173, 1977.
14. Wilcoxon, F. & Wilcox, R.A. — Some rapid approximate statistical procedures. New York, Lederle Laboratories, 1964.

# Properties of a new *Bacillus megaterium* bacteriophage with elongated head

Jan Dirk van Elsas  
Mônica M. Linhares  
& Elisa G.C. Penido

*Instituto de Microbiologia UFRJ, Centro de Ciências da Saúde  
Bloco I — Ilha do Fundão  
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

## Summary

A megaterium phage of unusual morphology was isolated from the soil and characterized. It is distinguished from the other described megaterium phages by its elongated head, showing the morphological features of licheniformis phage BLE. Other characteristics are its sensitivity to 60°C, fair resistance to chloroform and UV and inhibition of plaque formation at 42°C. The phage nucleic acid is double-stranded DNA with a G-C content of 34.7-36.7%.

## Resumo

*Características de um novo bactériofago de *Bacillus megaterium* com cabeça alongada*  
Foi isolado do solo um fago de *Bacillus megaterium*, com aspecto morfológico anormal. Difere dos outros fagos de *B. megaterium* pela presença de cabeça alongada, à semelhança do fago BLE de *B. licheniformis*. Como outras características analisadas neste fago apontou-se sensibilidade à temperatura de 60°C; resistências ao clorofórmio e luz ultra violeta e incapacidade de evidenciar placas de lise a 42°C. O fago está constituído de ADN de dupla fita com um teor G-C de 34,7 a 36,7%.

## Introduction

Phages of *Bacillus megaterium* are mostly of interest for genetic analysis of the host (6, 8, 18), and have also been used to study capsid formation (7). However, of all described megaterium phages (1, 6, 7, 8, 12, 18, 19), only one has been found to transduce (18). These phages all showed common morphologies when examined under the electron microscope and belong to Bradley's groups A, B or C (4). One of our isolates, obtained recently from soil, proved to be morphologically different from the other hitherto described megaterium phages and was therefore further characterized. The properties of this new phage are reported here.

## Material and Methods

The bacterial strains, used for determination of the host range, are listed elsewhere (11). Phage MJ-4 was obtained from garden soil collected at Fundão Island, Rio de

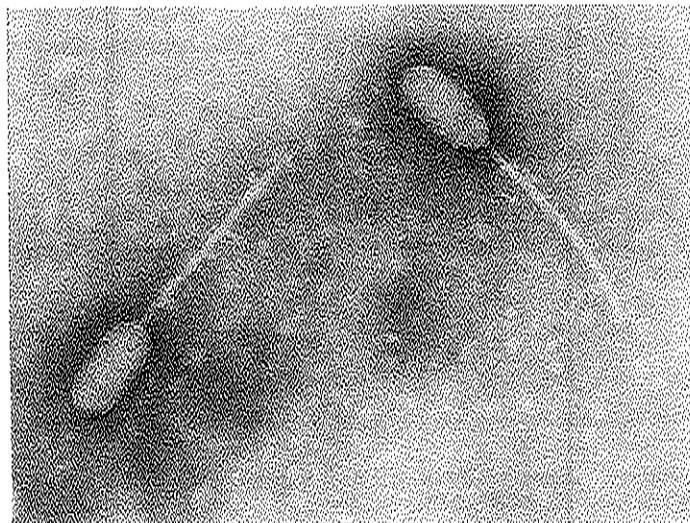
Janeiro, by isolation method A (10). *B. megaterium* strain F<sub>4</sub>, obtained from the same soil, was used as a host. Phages were assayed by Adams' double agar layer method (3) using TYS agar (1.75%) and soft agar (0.875%) described elsewhere (10). Crude phage stocks were prepared by Adams' plate washing method, and were stored at 4°C. These lysates were concentrated by polyethylene glycol precipitation (10) and purified by CsCl density gradient centrifugation at 4°C (120,000xg, 42h). CsCl was removed by extensive dialysis against TMK buffer (17). The phage buoyant density was inferred from CsCl gradients.

Morphology of the phage was examined under a Philips EM 201 electron microscope at 80kV. The preparations on formvar-coated grids were negatively stained with 2% sodium (dodeca) silico tungstate. The host range was determined as described (9). The burst size, latent period, adsorption and antigenic properties were established in accordance with Adams (3). The stability at different pH and temperature (8), the sensitivity to organic solvents and inorganic salts (6), the UV sensitivity (2) and the type of nucleic acid (4) were determined according to literature. The nucleic acid was extracted and purified by Marmur's method (14). The G-C mole percentage was determined using melting curves obtained in a Beckman Acta III spectrophotometer equipped with a temperature programmer, and from  $\rho_{25}$ , determined by CsCl gradient centrifugation in a Beckman model E centrifuge (16). *Escherichia coli* K12 DNA ( $\rho_{25} = 1.710$ ) was used as a reference.

## Results

At 37°C, phage MJ-4 forms a small (<1.5mm) irregular slightly turbid plaque with a fuzzy edge on its host *B. megaterium* F<sub>4</sub>. In rare cases, a concentric halo could be observed. The phage appears quite virulent for strain F<sub>4</sub>, since all attempts to obtain lysogenic clones failed. Out of 95 strains of *Bacillus* (11 species), only 4 megaterium strains permitted plaque formation (15 megaterium strains were resistant). MJ-4 is, therefore, specific for this species and shows a restricted host range. To determine possible relationship to phages FS-1 and FP-1, frequently encountered in Brazilian soil (9, 10), MJ-4 was tested with FS-1 and FP-1 antisera. The results revealed no antigenic relationship to either one of both phages. Electron microscopy (26 phage particles measured) revealed that MJ-4 possessed an elongated head 111 ± 2.6nm long and 51.6 ± 4.8nm wide, and a flexible non-contractile cross-striated tail of 234 ± 9.4nm length and 8.1 ± 1.9nm width. A thin collar connected head and tail, and a brush-like terminal appendage was attached to the tail (Figure 1). The phage belongs to Bradley's morphological group B (4). Crude lysates (titer 7.5 × 10<sup>10</sup> pfu/ml) were stable for at least 6 months at 4°C. MJ-4 was stable when maintained at 50°C for 60 min. At 60°C, it progressively lost titer (88% in 5min. and 99.7% in 15min.), and it was completely inactivated after 5min. at 70°C. The phage was stable for 2 hours in the pH range 6-9. At pH 5 and 10, respectively 70 and 80% of the phage was inactivated, and at pH 4, titers dropped below 0.01%. Treatment of MJ-4 with either n-hexane or 1-octanol did not result in loss of titer. However, the phage was moderately sensitive to toluene, benzene and chloroform with respectively 30% (toluene) and 40% (benzene, chloroform) inactivation. Upon UV irradiation, phage titers in TMK buffer dropped slowly with increasing dose. At 1180ergs/mm<sup>2</sup>, 99% of the phage was inactivated. Plaque formation was inhibited for 99% by 60mM phosphates (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> or K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), but not by KCl or K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Simultaneous use of 2.5 – 20mM CaCl<sub>2</sub> and 10<sup>-2</sup>mM MnSO<sub>4</sub> in the TY agar assured maximum efficiency of plating and distinct plaques. Mg<sup>2+</sup> ions could only partially substitute Ca<sup>2+</sup>. Plaques developed well in the temperature range 25-37°C, and most rapid plaque formation was at 37°C. At 42°C, plaque formation was completely inhibited. In the range 37-42°C, plaques became increasingly turbid and less distinct, and plaque counts dropped. The average burst size in TYS at 37°C was 204 and the latent period was 50min. In these conditions, the phage adsorbed fast to a mid-log culture of strain F<sub>4</sub> (91% in 10min.). The phage buoyant density in CsCl was

Figure 1 — Phage MJ-4, negatively stained with 2% sodium (dodeca)silico tungstate ( $\times 127,000$ )



1.49-1.50g/ml. Phage nucleic acid was double stranded DNA by Bradley's criteria (4). This was confirmed by its resistance to degradation by pancreatic RNase, and its pronounced hyperchromic effect (42%) in thermal melting curves. The thermal denaturation point of the DNA was 84.3°C, corresponding to a G-C mole % of 36.7 (16). The DNA buoyant density in CsCl was 1.694g/ml, which gives a G-C mole % of 34.7. These data indicate that the DNA does not contain unusual bases in high quantities. Attempts to use MJ-4 as a transducing vector failed at both high and low multiplicities, even with UV-irradiated phage (1% survival) and addition of phosphate or citrate to inhibit phage readsorption.

## Discussion

MJ-4 is a megaterium phage of unusual morphology. All other known megaterium phages, except for the recently described Bradley type C phages MP20, MP27 and MP49 (19), have regular polyhedral heads. Therefore, phage MJ-4 represents a new distinct megaterium phage type. The length of the head is consistently about twice its diameter; standard deviations in both measures are low, indicating that head poly- or bimorphism (4) is absent in MJ-4. Morphologies similar to that of MJ-4 have previously been observed for phages of *Caulobacter* (4), *Clostridium* (1) and also for phage BLE of *B. licheniformis* (13). However MJ-4 did not plaque on *B. licheniformis* (3 strains) and phage BLE was strictly specific for this species. Also, their DNA melting points were significantly different (84.3 vs 89°C). Phage MJ-4 can be classified in group B<sub>2</sub> of Ackermann's classification of *Bacillus* and *Clostridium* phages (1). This group contains exclusively *Clostridium* phages and of these, MJ-4 resembles *Clostridium* phage F<sub>1</sub> in morphology and head size. However, its tail is longer, the G-C content of its DNA is different (34.7-36.7% vs 40%) and host strain F<sub>4</sub> is strictly aerobic.

The other properties of MJ-4 do not seem unusual when compared with data for other megaterium phages (6, 7, 8, 19). Differentiating properties are its relative resistance to UV and organic solvents and the inhibition of plaque formation at 42°C. The specificity for *B. megaterium* is a feature shared with all megaterium phages found until now (1, 6, 7, 8, 12, 18, 19). Also, none of 14 *subtilis* and 16 *pumilus* phages could plaque on *B.*

*megaterium* (9, 10). These data suggest that the *B. megaterium* phage/host system is distinct within the genus *Bacillus*. The MJ-4 nucleic acid is double stranded DNA, as expected of Bradley type B phages (8). The G-C content is somewhat lower than that reported for other *megaterium* phages (1, 6, 8) and the range (37.3-43%) reported for the host (5).

## Acknowledgements

We thank R.G.P. Ramos for determination of the DNA buoyant density. Two of the authors (JDvE and EGCP) received grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Brazil.

## References

1. Ackermann, H.W. — La classification des bactériophages de *Bacillus* et *Clostridium*. Path. Biol., 22:909-917, 1974.
2. Ackermann, H.W.; Audurier, A.; Berthiaume, L.; Jones, L.A.; Mayo, J.A. & Vidaver, A.K. — Guidelines for bacteriophage characterization. Adv. Virus Res., 23:1-23, 1978.
3. Adams, M.H. — Bacteriophages. New York, Interscience Publishers, 1959.
4. Bradley, D.E. — Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bact. Rev., 31:230-314, 1967.
5. Candeli, A.; Debartolomeo, A.; Mastrandea, V. & Trotta, F. — Contribution to the characterization of *Bacillus megaterium*. Int. J. Syst. Bact., 29:25-31, 1979.
6. Carvalho, P.M. & Vary, J.C. — Isolation and characterization of a *B. megaterium* QM B1551 bacteriophage. J. Gen. Virol., 36:547-550, 1977.
7. Cassity, T.R. & Kolodziej, B.J. — Partial characterization of a new *Bacillus megaterium* bacteriophage and inhibition of bacteriophage adsorption by *B. megaterium* capsule. FEMS Microbiol. Letters, 5:61-63, 1979.
8. Cooney, P.H.; Jacob, J. & Slepecky, R.A. — Characteristics of a *Bacillus megaterium* bacteriophage. J. Gen. Virol., 26:131-134, 1975.
9. Elsas, J.D. van & Penido, E.G.C. — Characterization of phages of *Bacillus subtilis* isolated from Brazilian soils. Rev. Microbiol., 12:48-54, 1981.
10. Elsas, J.D. van & Penido, E.G.C. — Isolation and characterization of *Bacillus pumilus* phages from Brazilian soil. Z. Bakt. II Abt., 136, 1981.
11. Elsas, J.D. van; Pereira, M.T.P.R.R. & Penido, E.G.C. — Host range specificity of two groups of soil-isolated *Bacillus* phages. Rev. Microbiol., 13:57-64, 1982.
12. Hendry, G.S. & Fitz-James, P.C. — Characteristics of  $\phi$ T, the temperate bacteriophage carried by *Bacillus megaterium* 899A. J. Virol., 13:494-499, 1974.
13. Ludvík, J.; Erbenová, L. & Lipavská, H. — Ultrastructure of *B. licheniformis* bacteriophage BLE and its DNA. Virol., 77:872-875, 1977.
14. Marmur, J. — A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol., 3:208-218, 1961.
15. Marmur, J. & Doty, P. — Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol., 5:109-118, 1962.
16. Schildkraut, C.L.; Marmur, J. & Doty, P. — Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol., 4:430-443, 1962.
17. Steensma, H.Y. & Sondermeijer, P.J.A. — A counting method for determining the burst size of defective phages of *Bacillus subtilis*. Ant. van Leeuwenhoek, 43:305-316, 1977.
18. Vary, P.S. — Transduction in *Bacillus megaterium*. Biochem. Biophys. Res. Comm., 88:1119-1124, 1979.
19. Vary, P.S. & Halsey, W.F. — Host-range and partial characterization of several new bacteriophages for *Bacillus megaterium* QM B1551. J. Gen. Virol., 51:137-146, 1980.

## **Produção de enterotoxinas e resistência a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarréia**

Margaretti Simões Oliveira  
 Antonio F. Pestana de Castro  
 Marlene B. Serafim

*Deptº de Microbiologia e Imunologia UNICAMP, Cidade Universitária  
 13100 Campinas SP, Brasil*

& Manuel A.S.C. Portugal

*Instituto Biológico, Assessoria Técnica de Programação, Av. Cons. Rodrigues  
 Alves, 1252  
 01000 São Paulo SP, Brasil*

### **Resumo**

Setecentas amostras de *Escherichia coli*, isoladas de suínos com diarréia, foram examinadas quanto à produção de enterotoxina termolábil (LT). Destas, 500 foram estudadas quanto à produção de enterotoxina termoestável (ST). Outras características, normalmente investigadas em colibacilos enterotoxigênicos, como sorologia e resistência a drogas, também foram incluídas no estudo. Quatorze amostras (2%), quando ensaiadas em células da linhagem Y-1, produziram enterotoxina LT. A produção de enterotoxina ST, estudada pelo teste de camundongo recém-nascido, foi identificada em 23 amostras (4,6%). Nenhuma das amostras enterotoxigênicas produziu os dois tipos de enterotoxinas. As amostras positivas, no teste em células Y-1 (LT<sup>+</sup>), comportaram-se negativamente, quando ensaiadas através do teste de imuno-hemólise passiva (PIH). Entre as amostras LT<sup>+</sup> houve predominância do sorogrupo 0149 (6%); outros sorogrupo encontrados foram 08, 0105 e 0142. Entre as amostras ST<sup>+</sup> houve predominância do sorogrupo 0101 (47%); outros sorogrupo encontrados foram 07, 08, 080, 086, 0117 e 0138. As amostras enterotoxigênicas ST<sup>+</sup> foram mais resistentes à canamicina, ampicilina e mais sensíveis às tetraciclinas. As amostras enterotoxigênicas LT<sup>+</sup> foram mais sensíveis às tetraciclinas. Não houve diferença nos níveis de resistência para estreptomicina, cloranfenicol, gentamicina e sulfadiazina entre as amostras enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas.

### **Summary**

*Production of enterotoxin and drug resistance among strains of colibacilli isolated from swine diarrhea*

Seven hundred strains of *Escherichia coli* isolated from swine with diarrhea were examined for the production of heat-labile (LT) enterotoxin. From those, 500 strains were examined for the production of heat-stable (ST) enterotoxin. Other characteristics usually investigated among enterotoxigenic strains, such as serological grouping and drug resistance were also included in this study. Fourteen (2%) strains produced LT (LT<sup>+</sup> strains) as detected by the Y-1 adrenal cell assay. The production of ST was reported in 23 strains (4.6%) (ST<sup>+</sup> strains). None of the enterotoxigenic strains produced both enterotoxins concomitantly. Those strains which were positive in the Y-1

adrenal cell assay (LT<sup>+</sup>) were negative in the passive immune hemolysis test. Among the LT<sup>+</sup> strains serogroup 0149 was the most prevalent (6%). Other serogroups found were 08, 0105 and 0142. Among the ST<sup>+</sup> strains serogroup 0101 was the most prevalent (47%). Other serogroups found were 07, 08, 080, 086, 0117 and 0138. As far as drug resistance is concerned, the strains producing ST enterotoxin were more resistant to kanamycin, ampicillin and more sensitive to tetracyclines. LT<sup>+</sup> strains were more sensitive to tetracyclines. No differences were found among enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains in regard to resistance levels for streptomycin, cloramphenicol, gentamycin and sulphonamides.

## Introdução

A classificação sorológica ainda é bastante utilizada, para a identificação de colibacilos enteropatogênicos para o homem e animais. Atualmente, sabendo-se que pelo menos parte desta virulência pode ser explicada pela produção de enterotoxinas, a maioria dos laboratórios que se dedica a rotina bacteriológica tem procurado detectar nestes microrganismos a produção de enterotoxinas. Dois tipos de enterotoxinas têm sido descritos como responsáveis pela patogenicidade dos colibacilos; a enterotoxina termolábil (LT) de natureza proteica e imunogênica, da qual se conhece duas formas: uma de alto peso molecular (4), encontrada normalmente nos sobrenadantes de cultivos em meios líquidos apropriados (7); outra, de baixo peso molecular (8, 9), extraída pela polimixina, a partir de suspensões bacterianas. A outra toxina, termoestável (ST), também encontrada em sobrenadantes de culturas, é aparentemente não imunogênica, tratando-se provavelmente de um polipeptídeo (1). Embora alguns trabalhos já tenham sido realizados com relação à detecção de amostras de colibacilos enterotoxigênicos, isolados do homem (11), não encontramos, na literatura nacional, nenhum estudo referente a produção de enterotoxinas por amostras de colibacilos isoladas de suínos com diarréia.

Em virtude de implicações econômicas óbvias, que as diarréias por colibacilos podem causar à suinocultura, decidimos examinar amostras de *E. coli*, isoladas de suínos com diarréia. Paralelamente, as amostras enterotoxigênicas encontradas foram estudadas quanto à classificação sorológica e resistência a drogas. Neste último caso, visou-se principalmente investigar a existência de alguma correlação entre produção de enterotoxina e resistência a drogas, a semelhança do que foi descrito para amostras de origem humana (11).

## Material e Métodos

Foram examinadas 700 amostras de *E. coli*, isoladas de fezes de suínos com diarréia, na cidade de São Paulo e municípios vizinhos. As amostras foram isoladas e identificadas, segundo métodos descritos por Edwards & Ewing (5).

*Preparo e detecção de enterotoxina LT e ST* — Para a detecção das enterotoxinas ST e LT, através, respectivamente, dos testes de camundongo recém-nascido (2) e de células da linhagem Y-1 de tumor de adrenal de camundongo (3), foram utilizados os sobrenadantes das culturas de *E. coli* em meio de Caye (7), incubadas a 37°C, durante 24 horas, em estufa com agitação (150rpm). Os sobrenadantes, a serem ensaiados através dos testes de imunohemólise passiva (PIH), foram obtidos de culturas semeadas da maneira descrita (18), exceto que, antes da centrifugação, ao cultivo de cada amostra foi adicionado 1ml de polimixina B, diluída em salina tamponada com fosfatos (0.04M, pH 6.7), na concentração final de 2,2mg/ml do meio. As culturas foram incubadas a 37°C, com agitação por 15 minutos adicionais, procedendo-se em seguida a centrifugação, separando-se os sobrenadantes para exame pelo PIH.

Os testes em células Y-1 foram feitos assim que obtidos os sobrenadantes, enquanto que, para os testes de ST e PIH, os preparados foram mantidos congelados a -20°C, até o momento do uso.

Para os testes do camundongo recém-nascido e ensaio em células da linhagem Y-1, procedeu-se exatamente como o descrito na literatura (2, 3). O teste do PIH, para a detecção de enterotoxina LT, foi realizado de maneira semelhante ao descrito por Evans & Evans (6) porém, com algumas modificações por nós introduzidas. A suspensão de hemácias, a ser utilizada, foi padronizada de tal maneira que, quando diluída 1:20 em água destilada e lida em espectrofotômetro (Coleman Jr.) a 420nm, desse uma absorbância 1.3, indicando conter  $4 \times 10^{10}$  hemácias por ml.

Como antíseros, foram utilizados antitoxina LT, preparada com LT purificada de *E. coli* (D.J. Evans, Texas Medical Center Houston — USA); antitoxina colérica e anticoleragenóide, estes últimos gentilmente cedidos por G.T. Curlin (National Institutes of Health Bethesda, Maryland, U.S.A. Enteric Disease Program Officer). O antísero anti-LT foi usado na diluição 1:60 (D.J. Evans Jr. — comunicação pessoal). De acordo com resultados preliminares o anticoleragenóide foi diluído 1:80 e a antitoxina colérica a 1:80 e 1:640 (23).

Além dos extratos, obtidos de amostras LT positivas e LT negativas, usados como controles dos testes do PIH, tubos contendo os seguintes reagentes foram sistematicamente incluídos na reação, a fim de corrigir eventuais leituras de absorbância, resultantes de hemólise inespecífica: a) hemácias de carneiro, extrato em teste e tampão fosfato; b) hemácias de carneiro, extrato em teste, tampão fosfato e complemento; c) hemácias de carneiro, tampão fosfato, complemento e antísero (anti-LT ou anticoleragenóide ou antitoxina colérica).

Todas as outras condições, tais como reagentes e respectivos volumes, bem como detalhes técnicos, foram semelhantes as descritas originalmente (6).

*Sorologia* — A identificação sorológica das amostras produtoras de LT foi feita pelo Dr. Frits Ørskov (''WHO Collaborative Center for Reference and Research on *Escherichia coli*, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark'), e a sorologia das amostras produtoras de ST foi realizada pelo Dr. P.A.M. Guinée (Rijks Instituut voor de Volksgeondheid, Bilthoven, Netherlands).

*Determinação da sensibilidade a drogas* — Para avaliar a sensibilidade a drogas, utilizamos o método da diluição em placas (10) com as seguintes drogas: estreptomicina, canamicina, ampicilina e sulfadiazina (Laboratória Bristol S/A), gentamicina (Indústrias Farmacêuticas Schering S/A), cloranfenicol (Montemedison S/A), tetraciclina (Pfizer Química Ltda.).

## Resultados

*Produção de enterotoxina LT e ST* — Das 700 amostras isoladas, 14 (2%) demonstraram produzir enterotoxina LT, quando estudadas pelo teste em células de linhagem Y-1. Após um ano, quatro destas amostras se tornaram não enterotoxigênicas, quando examinadas por esta prova. Quando amostras que haviam sido positivas nos testes de Y-1, foram examinadas pelo teste do PIH verificou-se, curiosamente, que todas elas foram negativas, excetuando-se a nº 2423, que foi positiva neste teste, porém, somente quando se utilizou como reagente a antitoxina colérica diluída 1:80.

Entre 500 amostras de colibacilos, examinadas para a produção de ST, observou-se a existência de 23 (4,6%) capazes de produzir esta enterotoxina.

Nenhuma das amostras estudadas foi capaz de produzir LT e ST simultaneamente.

A análise dos resultados, pelo teste do qui-quadrado, demonstrou ser  $P < 0.005$ , revelando que o encontro de 23 amostras, produtoras de enterotoxina ST, é significativo, frente aos dados observados para as amostras enterotoxigênicas LT positivas.

**Sorologia** — Entre as 10 amostras que permaneceram LT positivas, mesmo após um ano, observou-se o predomínio do sorogrupo O149, que esteve presente em seis amostras.

Das outras quatro amostras, três foram classificadas nos sorogrupo O8, O105 e O142 e uma não aglutinou com os antisoros disponíveis.

Entre as 23 amostras ST positivas verificou-se predominância do sorogrupo O101, presente em 11 amostras. Entre as restantes foram encontrados os sorogrupo O3, O7, O8, O80, O86 e O138, sendo uma de cada sorogrupo, exceto para o sorogrupo O117 no qual foram encontradas duas amostras. Quatro amostras foram consideradas não tipáveis. Os resultados referentes aos achados sorológicos se acham na Tabela 1.

**Tabela 1** — Distribuição por sorogrupo das amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas isoladas de suínos com diarréia, São Paulo, SP, Brasil

Toxina produzida	Total de amostras	Sorogrupo encontrado <sup>a</sup>
LT	10	O149 (6) O142 (1) O8 (1) O105 (1)
ST	23	O101 (11) O138 (1) O117 (2) O86 (1) O80 (1) O7 (1) O8 (1) O3 (1)

<sup>a</sup> = 1 amostra LT+ não aglutinou com os soros O disponíveis;

5 amostras ST+ não foram tipadas.

LT = termo-lábil; ST = termo-estável

( ) = número de amostras.

**Determinação da sensibilidade a drogas** — Os resultados obtidos para amostras não enterotoxigênicas e enterotoxigênicas, com relação aos níveis de resistência aos antibióticos estudados, encontram-se na Tabela 2. A análise estatística destes resultados, pelo teste

**Tabela 2** — Níveis de resistência frente a agentes anti-microbianos das amostras de colibacilos enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas. Número de amostras resistentes (%)

Droga	Produção de enterotoxinas	Níveis de resistência (µg/ml)								
		1	5	10	20	50	100	200	500	1000
sulfadiazina	LT ST-	—	11(11%)	9(9%)	9(9%)	7(7%)	5(5%)	—	—	59(59%)
	LT+	3(30%)	—	—	—	—	—	—	—	7(70%)
	ST-	—	—	6(26%)	2(8,6%)	—	—	—	—	15(65%)
estreptomicina	LT ST	8(8%)	9(9%)	6(6%)	5(5%)	4(4%)	23(23%)	25(25%)	12(12%)	8(8%)
	LT+	2(20%)	—	1(10%)	—	2(20%)	1(10%)	4(40%)	—	—
	ST+	3(8,6%)	—	1(4,3%)	2(8,6%)	4(17,3%)	6(28%)	6(26%)	2(8,6%)	—
tetraciclina	LT ST	9(9%)	—	—	6(6%)	11(11%)	47(47%)	13(13%)	14(14%)	—
	LT+	—	—	—	—	1(10%)	7(70%)	2(20%)	—	—
	ST+	—	1(4,3%)	1(4,3%)	2(8,6%)	10(43,4%)	9(39%)	—	—	—
cloranfenicol	LT ST	36(36%)	13(13%)	9(9%)	9(9%)	—	7(7%)	24(24%)	6(6%)	—
	LT+	5(50%)	2(20%)	—	—	—	1(10%)	2(20%)	—	—
	ST+	12(52%)	—	—	—	3(13%)	6(26%)	2(8,6%)	—	—
canamicina	LT ST	9(9%)	—	21(21%)	8(8%)	8(8%)	6(6%)	5(5%)	11(11%)	32(32%)
	LT+	6(60%)	—	—	—	—	—	—	—	4(40%)
	ST+	4(17,3%)	—	—	—	—	—	4(17,3%)	2(8,6%)	13(56,3%)
ampicilina	LT ST	27(37%)	26(26%)	5(5%)	4(4%)	7(7%)	6(6%)	10(10%)	7(7%)	8(8%)
	LT+	1(10%)	1(10%)	—	—	—	—	4(40%)	4(40%)	—
	ST+	—	—	—	—	—	—	3(13%)	13(56,5%)	7(30,4%)

LT+ = amostras produtoras de enterotoxina LT

ST+ = amostras produtoras de enterotoxina ST

LT ST- = amostras não enterotoxigênicas

— = nenhuma amostra resistente.

de Kruskal Wallis (13) revelou que, com relação à estreptomicina, cloranfenicol e sulfadiazina, não houve diferença significativa nos dados encontrados para estes dois grupos. No que diz respeito à canamicina, o valor de P foi ligeiramente superior a 0.05, indicando que colibacilos produtores de ST poderiam ser mais resistentes à canamicina do que os produtores de LT e os não enterotoxigênicos.

Com referência às tetraciclinas, as amostras enterotoxigênicas pareceram mais sensíveis do que as não enterotoxigênicas ( $P < 0.01$ ). Saliente-se porém, que, com relação a este antibiótico, foi encontrada uma variação muito grande, ou seja, 9% das amostras foi relativamente sensível ao antibiótico enquanto 27% foi resistente a 200 µg/ml da droga.

Em relação à ampicilina, as amostras enterotoxigênicas foram significativamente ( $P < 0.01$ ) mais resistentes do que as não enterotoxigênicas.

## Discussão

A freqüência de amostras produtoras de enterotoxina termolábil (2%), identificadas pelo ensaio em células da linhagem Y-1, embora relativamente baixa, não está muito distante da observada por Giugliano & col. (11), no que concerne a amostras de colibacilos enterotoxigênicos isolados do homem.

Bem contrastantes foram os resultados para as amostras enterotoxigênicas produtoras de ST, com relação as quais se observou uma freqüência superior (4,6%). A análise estatística destes resultados, pelo teste do qui-quadrado, comprovou que, com relação à freqüência de amostras enterotoxigênicas entre suínos, a enterotoxina ST desempenha papel preponderante em relação a LT. Aliás, no que concerne a espécie humana, tem-se acumulado evidências de que esta enterotoxina seja igualmente importante, na etiologia das diarréias (15, 19, 22).

Bastante interessante foram os resultados obtidos quanto a produção de apenas um tipo de enterotoxina, entre as amostras enterotoxigênicas, isto é, nenhuma das amostras produtoras de LT produziu concomitantemente ST, ou vice-versa.

Embora a produção de apenas ST, por amostras de origem suína, já tenha sido relatada há algum tempo (24), tem sido postulado que a produção de LT viria sempre acompanhada da produção de ST (23). Idênticas observações indicavam que as amostras de origem humana deveriam se comportar de modo semelhante (21). Recentemente, verificou-se que várias amostras, isoladas da espécie humana e produtoras da enterotoxina LT, não elaboravam obrigatoriamente a enterotoxina ST (11). Porém, o que chama atenção em nossos achados é o caráter exclusivo de produção de apenas uma enterotoxina.

Para a identificação das amostras enterotoxigênicas produtoras de LT e ST foram utilizados métodos clássicos. Surpreendentes, no entanto, foram os resultados obtidos para a enterotoxina LT, quando utilizado o teste do PIH. A comparação dos resultados, obtidos neste teste, com aqueles observados no ensaio em células Y-1, demonstra que os colibacilos enterotoxigênicos, isolados de suínos, se comportam diferentemente dos isolados da espécie humana. Enquanto a quase totalidade das amostras enterotoxigênicas de origem humana fornecem resultados positivos, no teste do PIH (23), todas as amostras enterotoxigênicas, isoladas de suínos, com exceção de uma (N.º 2423), se comportaram negativamente (Tabela 1). A amostra mencionada forneceu, porém, resultados positivos apenas quando ensaiada frente ao soro anticólera diluído 1:80. Nesta diluição, sabe-se que o teste se torna mais sensível (23), mas nem por isso capaz de revelar a produção de enterotoxina termolábil, extraída pela polimixina nas demais amostras por nós estudadas. Uma explicação para tais resultados inesperados ainda não nos é conhecida.

Os resultados dos estudos sorológicos permitem verificar que os mesmos não diferiram daqueles encontrados na literatura (14, 24, 25, 26), para as amostras enterotoxigênicas de suínos. Assim sendo, entre as amostras LT<sup>+</sup> verificou-se a predominância do soro-

grupo O149, encontrado entre seis das 10 amostras ( $P < 0.001$ ). A presença do antígeno H10, observada em três das amostras deste sorogrupo, já havia sido verificada anteriormente (14). Outro sorotipo observado, no qual têm sido encontradas amostras enterotoxigênicas, é o O8:H18 (12). Com relação aos outros sorotipos, por nós observados, O142:NM e O105:H6, não encontramos citação de serem os mesmos enterotoxigênicos.

No que concerne à relação entre sorogrupo e a produção de enterotoxinas, têm sido relatados, como produtores de LT e ST, os sorogrupo O149 e O8 (24, 31). É pois curioso, ressalte-se mais uma vez, que todas amostras deste sorogrupo, por nós estudadas, produzissem exclusivamente LT. Com relação às amostras enterotoxigênicas, produtoras de ST, observou-se fenômeno semelhante, com predominância significante ( $P < 0.001$ ) do sorogrupo O101, que se distribuiu aproximadamente em 50% das amostras estudadas (Tabela 1). Os outros sorogrupo distribuiram-se em freqüência bastante reduzida, em comparação ao anterior. Para os sorogrupo O138 e O8, encontrou-se uma amostra de cada; no entanto, a importância dos mesmos, na etiologia da diarréia em suínos, tem sido relatada por diversos autores (12, 24, 31). Outros sorogrupo observados, com relação aos quais não encontramos citação de ocorrência como agente causal de diarréia em suínos, foram O86, O80, O7 e O117, todos eles representados por apenas uma amostra, exceção feita ao último, que foi encontrado em duas amostras. Destes, entretanto, alguns têm sido mencionados como ocorrendo em diarréia no homem ou outros animais. Em relação às amostras do sorogrupo O101, o fato delas terem produzido exclusivamente enterotoxina ST, já havia sido anteriormente mencionado por outros autores (17). A alta freqüência do sorogrupo O101, com 11 amostras, sugere que este sorogrupo está envolvido na produção de diarréias, não só em bovinos como também em suínos.

Embora o estudo da resistência a drogas de colibacilos, isolados de diferentes materiais, já tenha sido realizado entre nós, em diversas oportunidades (18, 27, 28, 29), desconhecemos, até o presente momento a existência de um estudo que correlacionasse enterotoxigenicidade e resistência a drogas. Os resultados obtidos demonstraram, quer como consequência cromossômica, quer como extra-cromossômica, que as amostras ST<sup>+</sup> foram, aparentemente, na sua maioria, mais resistentes à canamicina e ampicilina.

Para uma amostra de *E. coli* (sorotipo O78:H12), uma associação entre produção de enterotoxina ST e gens determinantes para resistência múltipla, incluindo a canamicina, já havia sido demonstrada (30). Com relação à maior resistência à ampicilina, apresentada pelas amostras ST, não encontramos nenhuma explicação e o assunto carece, ao nosso ver, de estudo profundo. Nosso objetivo seguinte foi tentar reproduzir os achados de Merson & col. (16) e Sack & col. (20), que verificaram serem as amostras de origem humana enterotoxigênicas, LT<sup>+</sup>, mais sensíveis a drogas do que as não enterotoxigênicas. Neste particular, observaram ainda que esta sensibilidade era maior em relação às tetraciclinas (Tabela 2). Nossos achados confirmam outros anteriormente citados (16, 20), no que concerne à relação entre maior sensibilidade à tetraciclina e produção de LT. Sugerem, ainda, que esta correlação independe da origem das amostras, que no nosso estudo foi diferente das investigadas por aqueles pesquisadores. Por outro lado, a maior sensibilidade a este antibiótico, apresentada por nossas amostras ST<sup>+</sup> está em desacordo com a relatada por Merson & col. (16). Embora estes autores tivessem também encontrado maior sensibilidade das amostras ST<sup>+</sup> à tetraciclina, a significância de seus achados estava um pouco além dos limites de aceitação ao nível de 5%. Em relação aos nossos achados, o valor de  $P < 0.01$  demonstra que, pelo menos nas amostras estudadas, existiria também uma provável correlação entre sensibilidade às tetraciclinas e produção de ST.

Embora nossos estudos, com relação à resistência a drogas e produção de enterotoxina, não tenham mostrado diferenças significativas, no que concerne à estreptomicina, cloranfenicol e sulfadiazina, os resultados obtidos para canamicina, tetraciclina e ampicilina justificam, a nosso ver, uma investigação mais detalhada, sob o ponto de vista básico, visando estabelecer se realmente ocorrem fenômenos de compatibilidade e incompatibilidade entre plasmídeos *ent* e *R* contendo genes determinantes para resistência a estas dro-

gas. Sob o ponto de vista prático, à semelhança do que foi feito em relação à diarréia dos viajantes, na espécie humana (20), não julgamos viável a introdução de medidas profiláticas, baseadas na administração de tetraciclina, contra diarréia em suínos, causadas por colibacilos enterotoxigênicos. Os motivos são óbvios, mas os mais relevantes incluiriam: estudos mais detalhados para comprovar a eficiência deste recurso, aplicável aos animais; tempo de administração da droga, que não poderia ser muito extenso; e finalmente o perigo constante de se selecionar outras bactérias resistentes a antibióticos deste grupo.

## Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com auxílios concedidos pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Saúde Animal e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

## Referências Bibliográficas

1. Alderete, J.F. & Robertson, D.C. — Purification and properties of ent<sup>+</sup> *Escherichia coli* heat stable enterotoxin. 13<sup>th</sup> Joint Conference on Cholera. The United States Japan Cooperative Medical Science Program, p. 19-31, 1977.
2. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. — Test for *E. coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1973.
3. Donta, S.T.; Moon, H.W. & Whipp, S.C. — Detection of heat-labile *E. coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183:334-336, 1974.
4. Dorner, F. — *Escherichia coli* enterotoxin: purification and partial characterization. *The J. Biol. Chem.*, 250:8712-8719, 1975.
5. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. — Identification of enterobacteriaceae. 3. ed. Burgess Publishing, 1972.
6. Evans Jr., D.J. & Evans, D.G. — Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16:604-609, 1977.
7. Evans Jr., D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. — Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8:725-730, 1973.
8. Evans Jr., D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. — Polymyxin B]-induced release of low molecular weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10:1010-1017, 1974.
9. Evans Jr., D.J.; Evans, D.G.; Richardson, S.H. & Gorbach, S.L. — Purification of the polymyxin: released, heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, (supl.), 133:97-101, 1976.
10. Fernandes, M.R.F. — Resistência infecciosa a drogas em culturas de *Shigella*. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1968. (Tese de Doutoramento).
11. Giugliano, L.G.; Meneguetti, M.A.M. & Trabulsi, L.R. — Produção de enterotoxina LT por amostras de *Escherichia coli*. *Riv. Microbiol.* (S. Paulo), 9:11-17, 1978.
12. Kohler, E.M. — Enterotoxin activity of filtrates of *Escherichia coli* in young pigs. *Amer. J. Vet. Res.*, 29:2263-2274, 1968.
13. Kruskal, W.H. & Wallis, W.A. — Use of ranks in one criterium variance analysis. *J. Amer. Statist. Ass.*, 47:583-621, 1952.
14. Larivière, S.; Cyles, C.L. & Barnum, D.A. — A comparative study of the rabbit and pig gut loop systems for the assay of *Escherichia coli* enterotoxin. *Can. J. Comp. Med.*, 36:319-327, 1972.
15. Levine, M.M.; Caplan, E.S.; Waterman, D.; Cash, R.A.; Hornick, R.B. & Snyder, M.J. — Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 17:78-82, 1977.
16. Merson, H.M.; Sack, R.B.; Islam, S.; Saklayen, J.G.; Huda-Nural Kibriya, A.K.M.G.; Mahmud, A.; Ahmed, A.S.; Oder, A.; Yoiken, R.H.; Rahaman, M. & Zapikian, A.Z. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETCE) disease in Bangladesh: clinical, therapeutic and laboratory aspects. 13<sup>th</sup> Joint Conference on Cholera. The United States Japan Cooperative Medical Science Program, p. 343-359, 1977.
17. Moon, H.W.; Nagy, B.; Isaacson, R.E. & Ørskov, I. — Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99<sup>+</sup> enterotoxigenic *E. coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.*, 15:614-620, 1977.

18. Moreno, G. — Resistência a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32:63-68, 1972.
19. Reis, M.H.L. dos; Pestana de Castro, A.F.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. — Production of heat-stable enterotoxin by O128 serogroup of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 24:289-290, 1979.
20. Sack, D.A.; Kaminski, D.C.; Sack, R.B.; Wamola, I.A.; Ørskov, F.; Ørskov, I.; Slack, R.C.B.; Arthur, R.R. & Kapikian, A.Z. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea of travellers: a prospective study of American peace corps volunteers. John Hopkins Med. J., 141:63-70, 1977.
21. Sack, R.B. — Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. of Microbiol., 29:333-353, 1975.
22. Sack, R.B.; Hirschhorn, N.; Brownlee, I.; Cash, R.A.; Woodwaard, W.A. & Sack, D.A. — Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrheal disease in Apache children. N. Eng. J. med., 292:1041-1045, 1975.
23. Serafim, M.B.; Pestana de Castro, A.F.; Reis, M.H. & Trabulsi, L.R. — Use of passive immune hemolysis to detect heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. Infect. Immun., 26:606-610, 1979.
24. Smith, H.W. & Gyles, C.L. — The relationship between two apparently different enterotoxins produced by enteropathogenic strains of *Escherichia coli* of porcine origin. J. Med. Microbiol., p. 387-401, 1970.
25. Smith, H.W. & Halls, S. — Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. J. Path. Bad., 93:531-543, 1967.
26. Smith, H.W. & Linggood, M.A. — Observations on the pathogenic properties of K88, Hly and Ent plasmids of *E. coli* with particular reference to porcine diarrhea. J. Med. Microbiol., 4:467-485, 1971.
27. Trabulsi, L.R. — Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. Rev. Microbiol. (Suplemento) São Paulo, 4:1-29, 1973.
28. Trabulsi, L.R. & Zuliani, M.E. — Estudos sobre a *E. coli*/O111-132. III — Sensibilidade in vitro à sulfadiazina e a seis antibióticos. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 11:323-334, 1969.
29. Vance, M.H. & Magalhães, M. — Distribuição de fatores de resistência entre culturas de *Escherichia coli* isoladas do ceco de bovinos. Rev. Microbiol. (São Paulo), 6:14-15, 1975.
30. Wachsmuth, I.K.; Falkow, S. & Ryder, R.W. — Plasmid mediated properties of a heat-stable enterotoxin producing *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. Infect. Immun., 14:403-407, 1976.
31. Whipp, S.C.; Moon, H.W. & Lyon, N.C. — Heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin production "in vivo". Infect. Immun., 12:240-244, 1975.

## Pesquisa de fatores de virulência em *Yersinia* enterocolitica

Maria Regina F. de Toledo

*Escola Paulista de Medicina, Disciplina de Microbiologia, Caixa Postal 20342  
01000 São Paulo SP, Brasil*

Marlene B. Serafim

*Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia, UNICAMP, Cidade Universitária  
13100 Campinas SP, Brasil*

Denise S.P.Q. Horton

*Escola Paulista de Medicina, Disciplina de Microbiologia  
& Deise P. Falcão*

*Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP*

*Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia e Imunologia, Campus de Araraquara  
14800 Araraquara SP, Brasil*

### Resumo

Cinquenta amostras de *Y. enterocolitica* (32 provenientes da coleção do Instituto Pasteur, Paris, pertencentes a diferentes sorotipos, e 18 isoladas no Brasil, pertencentes aos sorotipos O:3 e O:5) foram estudadas quanto à invasibilidade, pesquisada pelo Teste de Serény e em células HeLa, e quanto à produção de enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST). Também foi pesquisada, através de provas de hemaglutinação manose-resistente, a presença dos抗ígenos de aderência CFA/I, CFA/II, K88 e K99. Nenhuma amostra produziu enterotoxina LT ou apresentou hemaglutinação manose-resistente. Em células HeLa o teste foi positivo para 94,4% das amostras isoladas no Brasil e para 68,7% das amostras da coleção do Instituto Pasteur. No Teste de Serény, 77,7% das amostras isoladas no Brasil e 40,6% das amostras do Instituto Pasteur provocaram intensa conjuntivite em cobaias sem, entretanto, provocar a clássica ceratoconjuntivite, produzida por amostras virulentas de *Shigella*. Produção de enterotoxina ST foi observada em 18,0% das amostras. Tanto a invasibilidade como a produção de ST foram observadas em diferentes sorotipos.

### Summary

#### *Search for virulence factors in Yersinia enterocolitica*

A total of 50 cultures of *Yersinia enterocolitica* were examined for invasiveness and for heat-labile (LT) and heat-stable (ST) enterotoxins production. Thirty two of the strains, belonging to a variety of serotypes, were of the collection of Institut Pasteur, Paris, and the other 18, belonging to the serotypes O:3 and O:5, were isolated in Brazil. Invasive ability was examined in the guinea pig eye (Sérény test) and in HeLa tissue culture cells. By means of mannose-resistant hemagglutination tests the presence of adhesive factors CFA/I, CFA/II, K88 and K99 was also studied. None of the strains produced LT enterotoxin or showed mannose-resistant hemagglutination. The test performed in HeLa cells was positive for 94.4% of the strains isolated in Brazil and for 68.7% of those from Institut Pasteur. In the Sérény test, 77.7% of the strains isolated in

Brazil and 40.6% of those from Institut Pasteur evoked conjunctivitis in guinea pig eyes without, however, evoking keratoconjunctivitis as caused by virulent *Shigella* strains. Production of ST enterotoxin was observed in 18.0% of the strains. Invasiveness and ST enterotoxin were observed in different serotypes.

## Introdução

Os mecanismos de virulência de *Yersinia enterocolitica* apenas recentemente vêm sendo melhor estudados.

Em 1975, Carter (2) reproduziu, pela primeira vez, em animal de laboratório, uma infecção por *Y. enterocolitica*, semelhante à observada em alguns casos humanos, embora não tivesse chegado a nenhuma conclusão, quanto ao seu possível mecanismo de virulência. No mesmo ano, Une & col. (31) relataram a capacidade invasora de *Y. enterocolitica*, para células HeLa, o que foi, posteriormente, confirmado por outros autores (15, 16, 17).

Feeley & col. (9) verificaram que amostras de *Y. enterocolitica*, pertencentes ao sorotipo O:8, provocaram ceratoconjuntivite experimental em cobaias (Teste de Serény) (28).

Além da invasibilidade, a produção de enterotoxina termoestável (ST) também tem sido responsabilizada pela virulência de amostras de *Y. enterocolitica* (1, 9, 20, 24).

O presente trabalho relata os resultados obtidos com 50 amostras de *Y. enterocolitica*, de diferentes sorotipos, quanto à produção de enterotoxinas termolábil (LT) e termoestável (ST) e quanto à invasibilidade, estudada em cultura de células HeLa e pelo Teste de Serény. Foram pesquisados, também, os抗ígenos de aderência, CFA/I (8), CFA/II (5), K88 (14) e K99 (18), que ocorrem em amostras enterotoxigênicas de *Escherichia coli*, uma vez que trabalhos recentes têm demonstrado que os genes responsáveis pela produção de enterotoxina ST e pela síntese do fator de aderência CFA/I podem estar situados em um mesmo plasmídio (23).

## Material e Métodos

**Amostras** — a) Da coleção do Instituto Pasteur de Paris, foram estudadas 32 amostras, de diferentes sorotipos, classificados segundo Wauters & col. (34, 35), isoladas anteriormente a 1972, sendo 20 de origem humana e 12 de origem animal (Tabela 1); b) Isoladas no Brasil, foram estudadas 18 amostras, sendo 12 do sorotipo O:3 e seis do sorotipo O:5, isoladas do homem e de animais (Tabela 2), no período de 1968 a 1980.

**Pesquisa de invasibilidade** — a) Em células HeLa, foi utilizado, basicamente, o método descrito por Lee & col. (16), diferindo apenas no fato de que a motilidade das amostras não foi ativada, tendo em vista resultados preliminares, obtidos em nosso laboratório, indicarem ser este procedimento desnecessário; b) Em olho de cobaias, foi empregado o método de Serény (28) sendo o inóculo, para o teste, obtido a partir de amostras cultivadas em "tryptic soy agar" (Difco), a 25°C por 48 horas, segundo as recomendações de Feeley & col. (9). O crescimento bacteriano foi suspenso em salina a 0,85%, de maneira a se obter ao redor de  $10^{11}$  cel./ml, sendo 0,1 ml desta suspensão inoculado no saco conjuntival do animal que foi observado, diariamente, por 7 dias. Foram utilizados, como controle positivo, uma amostra virulenta de *Shigella flexneri* (452-79 CII) e, como controle negativo uma amostra não invasora de *E. coli*.

**Pesquisa de enterotoxinas termoestável (ST) e termolábil (LT)** — As amostras foram cultivadas a 26°C por 48 horas, em estufa com agitação (150rpm), em três diferentes meios de cultura: o meio de Caye (6), utilizado para a pesquisa de enterotoxinas LT e ST em

Tabela 1 — Sorotipos e fontes de isolamento das 32 amostras de *Y. enterocolitica* da coleção do Instituto Pasteur

Sorotipo 0	N.º de amostras isoladas		Total
	Humanos	Animais	
1, 2a, 3	—	4	4
2a, 2b, 3	—	1	1
3	3	1	4
4, 32	—	1	1
5	—	3	3
5, 27	—	1	1
6, 30	1	—	1
7, 8	—	1	1
7, 13	1	—	1
8	2	—	2
8, 19	1	—	1
9	4	—	4
10[K1]	1	—	1
14	1	—	1
15	1	—	1
18	1	—	1
20	1	—	1
21	1	—	1
22	1	—	1
34	1	—	1
Total	20	12	32

Tabela 2 — Características das 18 amostras de *Y. enterocolitica* isoladas no Brasil

Biotipo	Sorotipo	Fagotipo	Fonte de isolamento	N.º de amostras	Isolada por
4	O:3	VIII	homem	1	Pizzolitto & col. (22) <sup>a</sup>
				1	Fontes & col. (10) <sup>a</sup>
				2	Baldacci & col. (*)
			sagüi	3	Giorgi & col. (13) <sup>a</sup>
			porco	2	Decarlis & Seabra (*)
			sagüi	1	Genovez & col. (12) <sup>a</sup>
2	O:5	X <sub>2</sub>	cão	2	Nunes & Ricciardi (*)
		X <sub>2</sub>			
1	O:5	X <sub>2</sub>	homem	5	Stumpf & col. (29) <sup>a</sup>
	O:5	X <sub>2</sub>	homem	1	Toledo & Falcão (30) <sup>a</sup>

a = referências bibliográficas

(\*) = dados não publicados.

amostras de colibacilos, o meio descrito por Pai & Mors (20) e o meio de "tryptic soy broth" (Difco), suplementado com 0,6% de extrato de levedura, utilizado por Boyce & col. (1). Para a pesquisa de LT as culturas foram tratadas com polimixina (7), tendo sido utilizado o teste de imunohemólise passiva (PIH), descrito por Evans & Evans (4), observando-se as modificações de Serafim & col. (27). Para a pesquisa de ST, excluiu-se o tratamento com polimixina, tendo sido utilizado o teste do camundongo recém-nascido, descrito por Dean & col. (3). Foram utilizados quatro camundongos para cada teste e o resultado foi interpretado calculando-se a razão: peso dos intestinos/peso das carcaças. Foram considerados positivos valores  $\geq 0,083$ .

*Pesquisa de抗igenos de aderência* — Para a pesquisa presuntiva do antígeno CFA/I foram utilizadas provas de hemaglutinação em lâmina, com hemácias humanas dos grupos A, B, AB e O, em presença de manose, procedendo-se conforme recomendado por Evans & col. (8). Para a pesquisa do antígeno CFA/II, provas de hemaglutinação em lâmina foram realizadas com hemácias bovinas em presença de manose (5). Os抗igenos K88 e K99 foram investigados através da técnica de microhemaglutinação manose-resistente, de acordo com Jones & Rutter (14), utilizando-se suspensões padronizadas de hemácias de cobaio ( $10^8$  hemácias/ml). Controles adequados foram utilizados em cada série de experimentos.

## Resultados

*Antígenos de aderência* — Nenhuma amostra apresentou hemaglutinação manose-resistente, sugestiva da presença dos抗igenos de aderência CFA/I, CFA/II, K88 e K99.

*Sorotipos e invasibilidade* — A invasibilidade, avaliada em células HeLa e pelo teste de Serény, foi positiva em vários dos sorotipos (Tabela 3). No teste de Serény algumas amostras provocaram, 24 a 48 horas após a inoculação, intensa conjuntivite caracterizada por grande hiperemia, edema conjuntival e secreção mucóide em quantidade moderada; a conjuntivite regrediu após 24 a 48 horas. Nenhuma das amostras provocou a clássica ceratoconjuntivite, produzida por amostras invasoras de *Shigella* (28), mesmo quando o teste foi realizado, imediatamente após o isolamento da amostra.

Vinte e três amostras, de diferentes sorotipos, foram positivas nos dois testes de invasibilidade, dezesseis positivas apenas no teste em células e quatro positivas apenas no teste de Serény.

**Tabela 3** — Invasibilidade para células HeLa, teste de Serény e enterotoxigenicidade nos diferentes sorotipos de *Y. enterocolitica*

Sorotipo O	Nº de amostras	Nº de amostras positivas		
		HeLa	Serény <sup>a</sup> (conjuntivite)	ST <sup>b</sup>
1, 2a, 3	4	3	2	—
2a, 2b, 3	1	—	—	—
3	16	16	10	2
4, 32	1	1	1	—
5	9	7	7	2
5, 27	1	1	1	—
6, 30	1	1	—	—
7, 8	1	—	—	—
7, 13	1	—	1	—
8	2	2	—	—
8, 19	1	—	1	—
9	4	4	2	2
10 [K1]	1	—	—	—
14	1	1	1	1
15	1	1	—	—
18	1	1	—	—
20	1	1	—	—
21	1	—	—	1
22	1	—	1	1
34	1	—	—	—
Total	50	39	27	9

<sup>a</sup> = Nenhuma amostra provocou ceratite visível a olho nu; <sup>b</sup> = ST = enterotoxina termoestável; — = nenhuma amostra.

**Sorotipos e produção de enterotoxina** — Nenhuma amostra produziu enterotoxina LT. Nove amostras, pertencentes a seis sorotipos diferentes, produziram enterotoxina ST (Tabela 3), em pelo menos um dos três meios de cultura utilizados. Seis amostras, distribuídas entre os sorotipos O:3, O:9, O:14 e O:20 foram, simultaneamente, positivas nos testes de ST e HeLa.

**Correlação entre invasibilidade, produção de enterotoxina ST e origem das amostras** — Das 32 amostras da coleção do Instituto Pasteur, vinte e dois (68,7%) invadiram células HeLa, treze (40,6%) provocaram conjuntivite em cobaios e seis (18,7%) produziram enterotoxina ST. Das 18 amostras isoladas no Brasil, dezessete (94,4%) foram positivas em HeLa, quatorze (77,7%) provocaram conjuntivite em cobaios e três (16,6%) produziram ST (Tabela 4).

**Tabela 4** — Correlação entre invasibilidade, produção de enterotoxina ST e origem das amostras de *Y. enterocolitica*

Origem	Nº de amostras	Nº e (%) de amostras positivas		
		HeLa	Serény <sup>a</sup> (conjuntivite)	ST
IP <sup>b</sup>	32	22(68,7)	13(40,6)	6(18,7)
Brasil <sup>c</sup>	18	17(94,4)	14(77,7)	3(16,6)
Total	50	39(78,0)	27(54,0)	9(18,0)

a = Nenhuma amostra provocou ceratite visível a olho nu; b = amostras da coleção do Instituto Pasteur, Paris, representada por vários sorotipos; c = amostras isoladas no Brasil — sorotipos O:3 e O:5 apenas.

**Correlação entre invasibilidade, produção de enterotoxina ST e fontes de isolamento** — Invasibilidade para células HeLa foi observada em 76,6% das amostras de origem humana e em 80,0% das amostras isoladas de animais. No teste de Serény, conjuntivite foi observada em 46,6% das amostras de origem humana e em 65,0% das amostras de origem animal. O teste de ST foi positivo, respectivamente, para 26,6% e 5% das amostras de origem humana e animal (Tabela 5).

**Tabela 5** — Correlação entre invasibilidade, produção de enterotoxina ST e fontes de isolamento das amostras de *Y. enterocolitica*

Fontes de isolamento	Nº de amostras	Nº de amostras positivas		
		HeLa	Serény <sup>a</sup> (conjuntivite)	ST
humana	30	23(76,6)	14(46,6)	8(26,6)
animal	20	16(80,0)	13(65,0)	1(5,0)

a = Nenhuma amostra provocou ceratite visível a olho nu.

## Discussão

Os resultados do presente trabalho (Tabela 3) e de outros da literatura (16, 21) sugerem que fatores de virulência (invasibilidade e produção de ST) podem estar presentes em uma variedade de sorotipos de *Y. enterocolitica*, inclusive em alguns raramente associa-

dos a infecções. Entretanto, não seria prudente estabelecer rígida correlação entre a presença destes fatores e virulência "in vivo". Este conceito é reforçado pelos trabalhos de Une & Zen-Yoji (33), que demonstraram ser o teste de invasibilidade em células HeLa insuficiente para avaliar a patogenicidade de *Y. enterocolitica*, uma vez que amostras invasoras para as células podem ser avirulentas para animais. Por outro lado, observaram estreita correlação entre virulência das amostras e habilidade de sobreviver e multiplicar no interior de macrófagos. Amostras negativas em HeLa são, provavelmente, não invasoras para animais.

Considerando que a enterotoxina ST não é sintetizada "in vitro", à temperatura do corpo humano (9, 20, 24), seu papel na potogenicidade de *Y. enterocolitica* tem sido questionado (20, 21, 24). Entretanto, a enterotoxina poderia ser produzida em alimentos contaminados que, ingeridos, poderiam causar doença.

No presente estudo, nenhuma das amostras provocou, em cobaios, a clássica catoconjuntivite, causada por amostras invasoras de *Shigella* (28), mesmo seguindo as recomendações de Feeley & col. (9) para a realização do teste e utilizando amostras recém isoladas, o que ocorreu com algumas amostras dos sorotipos O:3 e O:5, isoladas no Brasil.

Amostras de vários sorotipos provocaram intensa conjuntivite nos animais (Tabela 3) sem, entretanto, haver envolvimento, visível a olho nu, da córnea. Schiemann & Devenish (25), estudando 31 amostras de *Y. enterocolitica* de vários sorotipos, também, observaram que a infecção ocular estava limitada à conjuntiva. Estudos realizados com amostras do sorotipo O:3, isoladas de materiais clínicos, mostraram resultados negativos no teste de Serény, mesmo variando as condições de crescimento das amostras e volume do inóculo (20).

Embora Feeley & col. (9) tenham relatado severa ceratite, em cobaios inoculados com amostras de *Y. enterocolitica* do sorotipo O:8, isoladas de uma epidemia de gastroenterite, no presente trabalho amostras deste sorotipo não provocaram nenhuma reação nos animais. Outros autores (25) observaram intensa conjuntivite, sem ceratite associada, com apenas algumas amostras do sorotipo O:8, o que os levou a concluir ser a virulência variável entre as amostras deste sorotipo.

Em nossos estudos, quatro amostras, de diferentes sorotipos, provocaram conjuntivite em cobaios sem, entretanto, mostrar infectividade para células HeLa (Tabela 3), sugerindo que a conjuntivite nestes animais deve ser resultante de fatores que independem da invasibilidade.

Nas amostras estudadas, a invasibilidade para células HeLa foi mais freqüente (78,0%) que a capacidade de causar conjuntivite em cobaios (54,0%) (Tabela 4), indicando ser o teste de Serény menos sensível para determinar invasibilidade em *Y. enterocolitica*. Além disto, este teste parece não ser perfeitamente reproduzível para este grupo de bactérias (26).

É interessante salientar que todas as amostras isoladas no Brasil, com exceção de uma proveniente de material de garganta, mostraram invasibilidade para HeLa, enquanto que para as amostras da coleção do Instituto Pasteur, este teste foi positivo para uma porcentagem menor de amostras (68,7%) (Tabela 4). Estes dados poderiam ser explicados pelo fato de que a invasibilidade destas amostras poderia ser mediada por plasmídios, como já foi demonstrado em amostras do sorotipo O:8 (11) e, portanto, ser perdida após prolongada estocagem das amostras. Entretanto, estes resultados, também, poderiam ser explicados pelo fato das amostras isoladas no Brasil pertencerem apenas aos sorotipos O:3 e O:5 (Tabela 2), usualmente referidos como invasores para HeLa (16, 17, 32).

A produção de enterotoxina ST foi observada em 18,0% das amostras de diferentes sorotipos (Tabelas 3 e 4), sendo que 66,6% das positivas, pertencem aos sorotipos causadores de doenças no homem com maior freqüência (O:3, O:5 e O:9). Porcentagem bem maior (64,7%) de amostras de *Y. enterocolitica*, produtoras de ST, foi obtida por Pai & col. (21), tendo ainda estes autores observado que esta propriedade estava freqüentemente associada a sorotipos, responsabilizados por infecções humanas. Por outro lado, Robins-

Browne & col. (24), estudando 26 amostras, pertencentes a 9 sorotipos, observaram que apenas três produziam ST.

As baixas porcentagens de amostras positivas para ST, observadas em nosso trabalho, poderiam ser explicadas pelo tempo de leitura do teste, que foi de quatro horas, ao invés de duas, como recentemente recomendado por Nunes & Ricciardi (19). Poderia explicar, também, este resultado a prolongada estocagem de muitas amostras, o que poderia resultar na perda da capacidade de produzir ST, se esta propriedade for mediada por plasmídio, como ocorre em colibacilos enterotoxigênicos (23).

Não foram encontrados nas amostras de *Y. enterocolitica* os fatores de colonização que ocorrem em colibacilos enterotoxigênicos, fatores estes responsáveis pela adesão destes colibacilos à mucosa intestinal. Outros fatores de colonização ainda não foram descritos em *Y. enterocolitica*.

## Agradecimentos

Agradecemos a Ilvan Ricciardi (Instituto de Microbiologia do Rio de Janeiro, UFRJ), M. Regina Decarlis (Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, Botucatu, UNESP) e Waldyr de Giorgi (Instituto Biológico, São Paulo) que gentilmente nos forneceram algumas das amostras estudadas neste trabalho.

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## Referências Bibliográficas

- Boyce, J.M.; Evans Jr., D.J.; Evans, D.G. & DuPont, H.L. — Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 25:532-537, 1979.
- Carter, P.B. — Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* for mice. *Infect. Immun.*, 11:164-170, 1975.
- Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. — Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
- Evans Jr., D.J. & Evans, D.G. — Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16:604-609, 1977.
- Evans, D.G. & Evans Jr., D.J. — A new surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect. Immun.*, 21:638-647, 1978.
- Evans Jr., D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. — Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8:725-730, 1973.
- Evans Jr., D.J.; Evans, D.G. & Gorback, S.L. — Polymyxin B induced release of low molecular weight, heat labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10:1010-1017, 1974.
- Evans, D.G.; Evans Jr., D.J. & Tjøs, W. — Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, 18:330-337, 1977.
- Feeley, J.C.; Wells, J.C.; Tsai, T.F. & Puhr, N. D. — Detection of enterotoxigenic and invasive strains of *Yersinia enterocolitica*. *Contr. Microbiol. Immunol.*, 5:329-334. Karger, Basel, 1979.
- Fontes, C.F.; Toledo, M.R.F.; Reis, M.H.L.; Murahovschi, 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.
- Gemski, P.; Lazere, J.R. & Casey, T. — Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 27:682-685, 1980.
- Genovez, M.E., Giorgi, W. & Simon, F. — Novo isolamento de *Yersinia enterocolitica* de sagüi (*Callitrix penicillata*). *Biológico (São Paulo)*, 46:303-305, 1980.

13. 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.
14. Jones, G.W. & Rutter, J.M. — The association of K88 antigen with hemagglutinating activity of porcine strains of *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 84:135-144, 1974.
15. Lee, W.H. — Testing for the recovery of *Yersinia enterocolitica* in foods and their ability to invade HeLa cells. Contr. Microbiol. Immunol., 5:228-233. Karger, Basel, 1979.
16. Lee, W.H.; McGrath, P.P.; Carter, P.H. & Eide, E.L. — The ability of some *Yersinia enterocolitica* strains to invade HeLa cells. Can. J. Microbiol., 23:1714-1722, 1977.
17. Maruyama, T.; Une, T. & Zen-Yoji, H. — Observations on the correlation between pathogenicity and serovars of *Yersinia enterocolitica* by the assay applying cell culture system and experimental mouse infection. Contr. Microbiol. Immunol., 5:317-323. Karger, Basel, 1979.
18. Morris, J.A.; Stevens, A.E. & Sojka, W.J. — Preliminary characterization of cell-free K99 antigen isolated from *Escherichia coli* B41. J. Gen. Microbiol., 99:353-357, 1977.
19. Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. — Detection of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin by suckling mouse bioassay. J. Clin. Microbiol., 13:783-786, 1981.
20. Pai, C.H. & Mors, V. — Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 19:908-911, 1978.
21. Pai, C.H.; Mors, V. & Toma, S. — Prevalence of enterotoxicity in human and nonhuman isolates of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 22:334-338, 1978.
22. Pizzolitto, 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. Karger, Basel, 1979.
23. Reis, M.H.L.; Affonso, M.H.T.; Trabulsi, L.R.; Mazaitis, A.J.; Maas, R. & Maas, W.K. — Transfer of a CFA/I-ST plasmid promoted by a conjugative plasmid in a strain of *Escherichia coli* of serotype O128ac:H12. Infect. Immun., 29:140-143, 1980.
24. Robins-Browne, R.M.; Jansen van Vuuren, C.J.; Still, C.S.; Miliotis, M.D. & Koornhof, H.J. — The pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis. Contr. Microbiol. Immunol., 5:324-328. Karger, Basel, 1979.
25. Schiemann, D.A. & Devenish, J.A. — Virulence of *Yersinia enterocolitica* determined by lethality in Mongolian Gerbils and by the Serény test. Infect. Immun., 29:500-506, 1980.
26. Schiemann, D.A.; Devenish, J.A. & Toma, S. — Characteristics of virulence in human isolates of *Yersinia enterocolitica*. Infect. Immun., 32:400-403, 1981.
27. Serafim, M.B.; Castro, A.F. Pestana de; Reis, M.H.L. & Trabulsi, L.R. — Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. Infect. Immun., 24:606-610, 1979.
28. Serény, B. — Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: a preliminary report. Acta Microbiol. hung., 2:293-296, 1955.
29. 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.
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. Une, T.; Osada, Y. & Ogawa, H. — Virulence of *Yersinia enterocolitica* in comparison to *Yersinia pseudotuberculosis*. Jap. J. Bact., 30:116, 1975.
32. Une, T.; Zen-Yoji, H.; Maruyama, T. & Yanagawa, W. — Correlation between epithelial cell infectivity in vitro and O-antigen groups of *Yersinia enterocolitica*. Microbiol. Immunol., 21:727-729, 1977.
33. Une, T. & Zen-Yoji, H. — Investigations on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* by experimental infections in rabbits and cultured cells. Contr. Microbiol. Immunol., 5:304-309. Karger, Basel, 1979.
34. Wauters, G.; Le Minor, L. & Chalon, A.M. — Antigènes somatiques et flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. Ann. Inst. Pasteur, 120:631-642, 1971.
35. Wauters, G.; Le Minor, L.; Chalon, A.M. & Lassen, J. — Supplément au schème antigénique de *Yersinia enterocolitica*. Ann. Inst. Pasteur, 122:951-956, 1972.

# Marcadores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa*. III — Correlação entre provas “in vivo” e “in vitro”\*

Margarida Diniz Melo Camargos

Dept.<sup>o</sup> de Ciências Biológicas, Universidade Católica de Minas Gerais,  
Caixa Postal 2686  
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

José Noronha Peres

Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG, Caixa Postal 2486  
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

& Sinval Martins de Melo

Dept.<sup>o</sup> de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG

## Resumo

A virulência de 12 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* com baixa atividade hemolítica ( $\leq 1:4$ ) e quatro amostras com altos títulos hemolíticos (1:512), procedentes de hospital (pacientes e meio ambiente) é estudada em camundongos convencionais e queimados. Os valores médios da  $LD_{50}$ , determinados para camundongos convencionais, foram  $10^{7.0}$  e  $10^{7.1}$ , respectivamente, para amostras de baixa e alta atividade hemolítica, o que não é estaticamente significativo ( $p > 0.05$ ). Os valores para camundongos queimados, encontrados para quatro amostras de título hemolítico 1:4 e quatro de título 1:512, são respectivamente,  $10^{6.8}$  e  $10^{6.1}$ , também não são significativos ( $p > 0.05$ ). As amostras classificam-se através dos valores da  $LD_{50}$ , em amostras de alta, média e baixa virulência, segundo critério adotado por Klynn & Gorrill.

## Summary

*Markers of virulence of Pseudomonas aeruginosa. III — Relation between “in vitro” and “in vivo” tests*

The virulence of 12 strains of *Pseudomonas aeruginosa* with low hemolysin production (titers of 1:4 or less) and four strains with high hemolysin titers (1:512) that were isolated from hospital (patients and environment) was studied in two groups of mice: a group of healthy mice, and a group of mice in which some degree of thermal injury had been induced. Each group of mice was challenged, by injection of the various cultures and  $LD_{50}$ 's were determined. For normal mice, the  $LD_{50}$ 's were  $10^{7.0}$  and  $10^{7.1}$ , respectively, for bacterial culture of low and high hemolysin production capability — not statistically significant ( $p > 0.05$ ). In the group of mice submitted to thermal injury, the  $LD_{50}$ 's were  $10^{6.8}$  and  $10^{6.1}$  respectively, for bacterial cultures of low (1:4) and high (1:512) hemolysin titers — again, not statistically significant. The  $LD_{50}$ 's obtained were used to classify the *Pseudomonas* strains into groups of high, intermediate, and low virulence in accordance with the report of Klynn & Gorrill.

\* Trabalho realizado no Instituto de Ciências Biológicas UFMG, com auxílio da CAPES e FINEP.

## Introdução

*Pseudomonas aeruginosa* é bactéria de vida livre, encontrada na água, solo e em ambientes úmidos, contendo traços de matéria orgânica. Participa da flora de determinados sítios, em pessoas normais (6, 20).

Em circunstâncias especiais, como em prematuros, velhos, queimados e indivíduos sob uso de imunossupressores, pode causar processos patológicos, às vezes graves, como septicemias, pneumonias, meningites, etc. Sua participação e importância nas infecções hospitalares tem sido muito enfatizada.

Coloniza, facilmente, pacientes hospitalizados, nos primeiros dias após a admissão, em virtude de sua prevalência no ambiente hospitalar, em pias, torneiras, instrumental, equipamento, pessoal, etc. (3, 6, 13).

Apesar disso, *Ps. aeruginosa*, não figura nas estatísticas das infecções hospitalares, como agente mais comum (1). Nesse particular, são de maior importância certas Enterobactérias, como *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. e alguns cocos Gram positivos da pele. Esta anomalia pode talvez ser explicada por fatores diversos como: padrão satisfatório de enfermagem, que pelo uso de técnica asséptica adequada, pode impedir a disseminação de *Ps. aeruginosa*, do ambiente aos pacientes; condições inerentes aos mecanismos de defesa do paciente; sua pequena participação na flora normal do homem e possibilidade de variação de virulência, entre as amostras.

Esta última hipótese vem sendo explorada por vários pesquisadores (1, 5, 8, 9, 17, 18) no sentido de se encontrar um marcador de virulência.

A ação patogênica de *Ps. aeruginosa* apresenta comportamento diferente de outros bastonetes Gram negativos, visto ser devida ao somatório dos efeitos de várias substâncias extracelulares, como "hemolisina", protease, collagenase, elastase, leucocidina, toxinas, etc.

A endotoxina de *Ps. aeruginosa* parece exercer papel menos importante ou insignificante, em relação a certos produtos extracelulares, de natureza enzimática ou tóxica, que vêm despertando o interesse dos pesquisadores, preocupados em conhecer sua natureza, atividade biológica e participação nos mecanismos de sua ação patogênica (9, 10, 11, 16). Entre essas substâncias, a "hemolisina" tem merecido especial atenção pelos efeitos tóxicos sobre animais e tecidos (10, 11, 19).

A ação patogênica de *Ps. aeruginosa* pode ser ensaiada em diferentes espécies animais, como camundongos, cobaias, coelhos, macacos, ratos e outros, nos quais a evolução da infecção depende, entre outros fatores, da dose e da via de inoculação. Quando a inoculação é feita em determinados sítios de animal imunocompetente, a infecção torna-se circunscrita à área inoculada e regrediu espontaneamente. Mas, se feita por via venosa ou peritoneal, a gravidade da infecção é maior e depende essencialmente da quantidade de bactéria injetada. Se a dose de germe for grande, a infecção será fatal. Neste caso, surge, geralmente, septicemia e, após a morte, verificam-se lesões renais características. Quando se inocula doses relativamente baixas, em qualquer animal imunocompetente, os mecanismos de imunidade não específica, como fagocitose pelos macrófagos e polimorfonucleares não sensibilizados, tendem a eliminar os microrganismos.

O animal imunoestimulado apresenta grande resistência à infecção por *Ps. aeruginosa*; nos imunodeprimidos (por drogas ou "stress"), a bactéria apresenta-se com virulência mais elevada (19).

Os modelos clássicos de virulência, relacionados com as propriedades das bactérias podem ser de três tipos: virulência pela invasão e multiplicação, virulência pela produção de toxinas e o modelo misto, invasão e produção de toxinas, ao qual pertence *Ps. aeruginosa* (19).

Tendo em vista a importância atribuída à "hemolisina", como indicador de virulência de *Ps. aeruginosa* (1), resolveu-se correlacionar a atividade hemolítica de amostras de *Ps. aeruginosa*, de origem hospitalar, com a DL<sub>50</sub> para camundongos convencionais e deprimidos por meio de queimadura (14).

## Material e Métodos

*Amostras de *Ps. aeruginosa** — As amostras de *Ps. aeruginosa* estudadas foram isoladas por Melo & Peres (13) de espécimes humanas e do meio ambiente do Hospital das Clínicas da UFMG.

*Produção e dosagem de hemolisina* — a "hemolisina" fração II de Liu foi produzida e extraída segundo técnica empregada por Liu, Abe & Bates (11) e titulada de conformidade com Berk (4).

*Camundongos* — Foram utilizados camundongos albinos, machos e fêmeas, indistintamente, de 20 a 27g de peso.

*Culturas* — As culturas, para inoculações em camundongos, foram obtidas em Trypticase Soy Broth (BBL), adicionado de 1g% de nitrato de potássio para assegurar o crescimento mais disperso, com redução da película que normalmente se forma nos meios líquidos convencionais, inoculados com *Ps. aeruginosa*. O número de células dos inóculos foi previamente determinado por contagem em placa, de acordo com normas recomendadas no Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (2) e em Noleto (15).

*Determinação da DL<sub>50</sub> para camundongos convencionais* — Os animais foram inoculados com 12 amostras de *Ps. aeruginosa*, de título hemolítico  $\leq 1:4$  e quatro 1:512. O inóculo consistiu de 0,5ml de cultura de 24h a 37°C e de suas diluições 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>, através da via intraperitoneal (IP) e utilizando-se lotes de seis, animais para cada concentração bacteriana. Um grupo de animais foi inoculado com o meio de cultura estéril. Cada lote de animais foi mantido em gaiola separada e observado diariamente. Durante os primeiros experimentos, conclui-se que o número de animais mortos não sofria variação considerável, após o quarto dia de inoculação. Determinou-se, então, a DL<sub>50</sub> pelo método de Reed & Muench, com os animais que morriam dentro desse prazo.

*Determinação da DL<sub>50</sub> para camundongos queimados* — Os animais foram anestesiados com éter etílico e queimados na cauda, patas traseiras e região da genitália, através de imersão em água a 70°C, por 5 segundos (14) e, em seguida, inoculados com quatro amostras de títulos hemolíticos baixos ( $\leq 1:4$ ) e quatro títulos altos (1:512), do modo descrito para os animais convencionais. Um lote de animais queimados foi inoculado com dose de 0,5ml de meio de cultura, como controle. A DL<sub>50</sub> foi determinada pelo método de Reed & Muench, utilizando-se os animais que morriam até quatro dias, a partir da inoculação, pois além desse tempo a morte ocorria raramente para estes animais.

*Análise estatística* — Foi realizada análise estatística, para comparar os resultados das DL<sub>50</sub> apresentadas pelos camundongos convencionais e queimados, inoculados com amostras de *Ps. aeruginosa*, de diferentes títulos hemolíticos. O esquema de análise obedeceu a delineamento inteiramente casualizado, em virtude de possíveis diferenças no número de grupos de camundongos empregados para cada título. As médias das DL<sub>50</sub> são comparadas pelo teste t de Student. Para os títulos de "hemolisina" comuns a camundongos convencionais e queimados, processou-se idêntica análise estatística para avaliar não só o efeito dos títulos, como também para testar os efeitos das queimaduras sobre a DL<sub>50</sub>.

## Resultados

Determinou-se a DL<sub>50</sub> para camundongos convencionais de 12 amostras de título  $\leq 1:4$  e de quatro de título 1:512, cujas médias foram, respectivamente, 10<sup>7,0</sup> e 10<sup>7,1</sup>. Em

virtude dos resultados obtidos não serem estatisticamente significantes ( $p>0,05$ ), foram escolhidas, aleatoriamente, quatro amostras de título baixo e quatro de alta atividade hemolítica, as quais foram inoculadas em camundongos queimados. Os valores médios da  $DL_{50}$  foram, respectivamente,  $10^{6,8}$  e  $10^{6,1}$ , também não significativos ( $p>0,05$ ). O coeficiente de variação da média (CV) foi de 8,5%, enquanto as diferenças mínimas significativas foram 0,7057 (dms 4 × 12), entre os resultados das  $DL_{50}$  para camundongos convencionais e 0,8643 (dms 4 × 4), para os queimados.

## Discussão

Al-Dujaili & Harris (1), procurando um marcador de virulência capaz de separar amostras infetantes e ambientais de *Ps. aeruginosa*, entre si, sugerem que a capacidade de produzir "hemolisina" pode ser um adequado marcador de virulência para *Ps. aeruginosa*.

Com base em resultados da  $DL_{50}$  para camundongos, Klynn & Gorrill (9) classificaram 20 amostras de *Ps. aeruginosa* em alta, média e baixa virulência, quando as  $DL_{50}$  variaram de  $4 \times 10^6$  a  $2,8 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  a  $7 \times 10^7$  e  $1 \times 10^8$  a  $4 \times 10^8$ , respectivamente. Transformando os dados acima em log10, temos para o primeiro grupo  $10^{6,7}$  a  $10^{7,4}$ , para o segundo  $10^{7,5}$  a  $10^{7,8}$  e para o terceiro,  $10^8$  a  $10^{8,6}$ .

Tendo como motivo a sugestão de Al-Dujaili & Harris (1), como parâmetro o critério de Klynn & Gorrill (9), resolveu-se correlacionar a atividade hemolítica de *Ps. aeruginosa* com a  $DL_{50}$  para camundongos. Todavia, os resultados finais mostram que as médias  $10^{7,0}$  e  $10^{7,1}$  das  $DL_{50}$  encontradas, respectivamente, para 12 amostras, de *Ps. aeruginosa* com títulos hemolíticos  $\leq 1:4$  e quatro amostras com título igual a 1:512, não foram estatisticamente significativas ( $p>0,05$ ).

Em virtude dos resultados obtidos, foram escolhidas, aleatoriamente, quatro amostras de *Ps. aeruginosa* com títulos altos e quatro com títulos baixos, as quais foram inoculadas em camundongos queimados, porque, segundo Millican, Evans & Markley (14), camundongos queimados moderadamente, com água a  $70^{\circ}\text{C}$ , são extremamente suscetíveis a dose de *Ps. aeruginosa* não letal para camundongos normais. Entretanto, os valores médios encontrados foram respectivamente  $10^{6,8}$  a  $10^{6,1}$ , também não significantes ( $p>0,05$ ). Esses resultados, que não mostram correlação entre essa prova e o título de hemolisina, estão, no entanto, em conformidade com os de Klynn & Gorrill (9), que não encontraram correlação na virulência de amostras de *Ps. aeruginosa* para camundongos convencionais e testes "in vitro".

Por outro lado, segundo o critério de Klynn & Gorrill (9), as 12 amostras de título hemolítico baixo são assim classificadas, nos três grupos: o de alta virulência, com seis amostras, com  $DL_{50}$  variando de  $1,9^{6,3}$  a  $10^{7,0}$ ; o de média virulência, com três amostras, variando de  $10^{7,3}$  a  $10^{7,4}$ ; e o de baixa virulência, com três amostras, variando de  $10^{7,5}$  a  $10^{7,8}$ . Das quatro amostras de título hemolítico 1:512 três apresentaram  $DL_{50}$  variando de  $10^{6,9}$  a  $10^{7,1}$ , que permite enquadrá-las no grupo de alta virulência. Todavia, uma apresentou  $DL_{50}$  igual a  $10^{8,1}$ , que a coloca entre as de baixa virulência.

Gaby & Logan (7), estudando a virulência de 14 amostras de *Ps. aeruginosa*, isoladas em laboratório clínico, verificaram que seis não matavam camundongos, quando inoculadas com 0,5ml de uma cultura em caldo. As demais podem ser classificadas do seguinte modo (segundo Klynn & Gorrill): uma, no grupo de alta virulência; duas no de média e cinco, no de baixa virulência.

Todas as nossas amostras foram letais para camundongos quando inoculadas em doses de 0,5ml de cultura em caldo.

Loiseau-Marolleau (12), determinando a  $DL_{50}$  de 21 amostras de *Ps. aeruginosa*, de origem humana, para camundongos, encontrou valores que variavam de  $10^{7,0}$  a  $10^{8,5}$ , resultados muito próximos aos do presente experimento.

## Agradecimento

Os autores agradecem ao Dr. Ivan Barbosa Machado Sampaio, Prof. da Escola de Veterinária da UFMG, pela análise estatística.

## Referências Bibliográficas

1. Al-Dujaili, A.H. & Harris, D.M. — *Pseudomonas aeruginosa* infection in hospital: a comparison between "infective" and "environmental" strains. *J. Hyg.*, 75:195-201, 1975.
2. American Public Health Association — Standard methods for the examination of water and wastewater, 13. ed. Washington, APHA, p. 660-662, 1971.
3. Bennet, J.V. — Hospital acquired infection and the altered host. *J. Infect. Dis. (suppl.)* 130:54-57, 1974.
4. Berk, R.S. — Production and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* hemolysin. *J. Bacteriol.*, 84:1041-1048, 1962.
5. Carmargos, M.D.M. — Marcadores de virulência da *Pseudomonas aeruginosa*. Belo Horizonte, 1977. (Tese de Mestrado).
6. Forkner Jr., C.E. — *Pseudomonas aeruginosa* infections. New York/London, Grune & Stratton, 1960.
7. Gaby, W.L. & Logan, C. — Pathogenicity of strains of *Pseudomonas aeruginosa* for mice. *J. Bacteriol.*, 82:149-150, 1961.
8. Kamps, K.C. & Ludovici, P.P. — Virulence measurements of *Pseudomonas aeruginosa* based on plaque and toxin Z formation in cell culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 147:629-634, 1974.
9. Klynn, K.M. & Gorrell, R.H. — Studies on the virulence of hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.*, 47:227-235, 1967.
10. Liu, P.V. — Factors that influence toxigenicity of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 88:1421-1427, 1964.
11. Liu, P.V.; Abe, J. & Bates, J.L. — The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis. *J. Infect. Dis.*, 108:218-228, 1961.
12. Loiseau-Marolleau — Virulence expérimentale de *Pseudomonas aeruginosa*, pour la souris: comparaison entre souches primaires et souches de l'environnement. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 128A:61-68, 1977.
13. Melo, S.M. & Peres, J.N. — *Pseudomonas aeruginosa* de origem hospitalar classificadas pela produção de piocina. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 9:169-176, 1978.
14. Millican, R.C.; Evans, G. & Markley, K. — Susceptibility of burned mice to *Pseudomonas aeruginosa* and protection by vaccination. *Ann. Surg.*, 163:603-610, 1966.
15. Noleto, A.L.S. — Comparação de métodos bacteriológicos quantitativos para avaliação da bactériuria. Rio de Janeiro, 1975. (Tese de Mestrado).
16. Schärmann, W.; Jacob, F. & Porstendörfer, J. — The cytotoxic action of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on human polymorphonuclear leucocytes. *J. Gen. Microbiol.*, 93:303-308, 1976.
17. Tabuchi, K. & Diena, B.B. — A cytotoxicity assay of *Pseudomonas aeruginosa* culture filtrates by a dye-uptake test. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, 8:353-364, 1974.
18. Tabuchi, K.; Sato, H. & Diena, B.B. — Pathogenic and immunological properties of culture of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.*, 20:1417-1422, 1974.
19. Véron, M. & Berche, P. — Virulence et antigènes de *Pseudomonas aeruginosa*. *Bull. Inst. Pasteur*, 74:295-337, 1976.
20. Young, V.M. — *Pseudomonas aeruginosa*, ecological aspect and patient colonization. New York, Raven Press, 1977.

## **Uretrites não gonocócicas masculinas associadas a Chlamydia, Ureaplasma e Trichomonas**

Marcelo Magalhães  
Marlene Andrade  
& Adelma Véras

*Laboratório de Patologia Clínica do Recife, Rua 7 de Setembro, 508  
50000 Recife PE, Brasil*

### **Resumo**

Espécimes uretrais de 144 pacientes portadores de uretrites não gonocócicas (UNG) foram examinados para a detecção de *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* e *Trichomonas vaginalis*. Clamídeas foram isoladas de 51% dos pacientes não previamente tratados e de 33% dos pacientes que haviam feito uso de drogas antimicrobianas, sem sucesso clínico ( $p < 0,05$ ). No que se refere ao ureaplasma e tricomonas, o uso prévio de drogas não influiu significativamente nos resultados das culturas. *U. urealyticum* foi encontrado em 39% dos 144 casos e *T. vaginalis* em 3%. Dezenas (12%) dos pacientes estavam simultaneamente infectados com *C. trachomatis* e *U. urealyticum*. Ureplasmas foram mais freqüentemente encontrados entre os pacientes clamídea-negativos ( $p < 0,05$ ). Se *U. urealyticum* e *T. vaginalis* são considerados como responsáveis por alguns casos de UNG clamídea-negativos, apenas 17% das uretrites não previamente tratadas permaneceram sem etiologia definida.

### **Summary**

*Male nongonococcal urethritis associated with Chlamydia, Ureaplasma and Trichomonas*

Urethral specimens from 144 patients with nongonococcal urethritis (NGU) were examined for *Chlamydia trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Trichomonas vaginalis*. Chlamydiae were isolated from 51% of non previously treated patients and from 33% of patients who have used several antimicrobial drugs without clinical response ( $p < 0,05$ ). Concerning ureaplasmas and trichomonas the previous use of drugs were not significantly associated with the results of the cultures. *U. urealyticum* was found in 39% of 144 cases and *T. vaginalis* in 3%. Seventeen (12%) of patients were simultaneously infected with *C. trachomatis* and *U. urealyticum*. Ureplasmas were more frequently found among patients from whom chlamydiae were not recovered ( $p < 0,05$ ). If *U. urealyticum* and *T. vaginalis* are regarded as responsible for some cases of chlamydiae-negative NGU, only 17% of 53 non previously treated urethritis remained non specified.

### **Introdução**

As uretrites não gonocócicas (UNG) vêm sendo referidas como a doença transmissível sexualmente mais comum na Europa (11, 12, 19) e Estados Unidos (6, 16). Elas

foram reconhecidas como entidade clínica, diferente da gonorréia; desde fins do século passado e, ao longo do tempo, vários microrganismos têm sido tentativamente associados à sua etiologia (5). Atualmente, entretanto, estudos microbiológicos bem conduzidos apontam apenas *Chlamydia trachomatis* e em menor grau de importância *Ureaplasma urealyticum* como potencialmente responsáveis pela maioria dos casos de UNG (6, 10, 11, 13, 16, 19).

Neste trabalho, cujo propósito foi verificar, através da cultura, a ocorrência daqueles microrganismos e também de *Trichomonas vaginalis* em portadores de UNG na cidade do Recife, *Chlamydia* foi o microrganismo mais freqüente e ureplasmas foram significativamente mais isolados das uretrites clamídea-negativas.

## Material e Métodos

**Pacientes** — Duzentos e catorze homens, portadores de corrimento uretral evidente à inspeção, foram inicialmente examinados. Destes, selecionou-se para o estudo 144 pacientes dos quais não foi possível isolar *Neisseria gonorrhoeae*. Os portadores de UNG foram divididos em dois grupos, de acordo com o uso prévio de drogas antimicrobianas. O primeiro consistiu de 53 pacientes virgens de tratamento (grupo não tratado), enquanto o outro grupo incluiu 91 pacientes que haviam sido medicados para o presente episódio de uretrite, sem qualquer sucesso clínico (grupo tratado). Os pacientes deste grupo permaneceram, pelo menos, quatro dias sem medicação antes da coleta do material. Trinta e um indivíduos do sexo masculino, sem sintomas clínicos de uretrite, foram também incluídos na investigação (grupo controle).

**Coleta dos espécimes** — Os pacientes compareceram ao laboratório antes da primeira micção matinal. Um "swab" de algodão era introduzido na uretra 2 a 3cm e em seguida agitado em tubo de hemólise, contendo 0,2ml de caldo de coração e cérebro (BHI). O "swab" era reintroduzido, friccionado levemente nas paredes da uretra e agitado em outro tubo contendo 2ml de meio de transporte para *Chlamydia*, isto é o meio de crescimento (ver nos métodos microbiológicos), desprovido de desoxiuridina e adicionado de glicose 0,5g%, anfotericina B 2,5 µg/ml e vancomicina 50 µg/ml.

**Métodos microbiológicos** — *C. trachomatis* — na investigação de *C. trachomatis* seguiram-se, em linhas gerais, as recomendações de Reeve & col. (12). Células McCoy, generosamente enviadas por Sandy Boulding da University Medical College, Londres, foram cultivadas como monocamadas sobre laminulas circulares de 12mm em tubos de centrifugador de fundo chato. O meio de crescimento utilizado foi o meio basal de Eagle adicionado de soro fetal bovino 10%, glutamina 1% de uma solução concentrada contendo 30mg/ml, vitaminas 1% de uma solução 100X concentrada (Flow lab.), gentamicina 10 µg/ml e desoxiuridina 25 µg/ml (Sigma). As monocamadas celulares foram incubadas a 35°C e usadas no isolamento de clamídeas, desde a idade de dois até o sétimo dia. No momento de usar substituía-se o meio de crescimento pelo meio de transporte contendo o espécime uretral; os tubos eram centrifugados a 6000rpm durante 1h e em seguida incubados a 35°C por 48h. O meio de cultivo era removido, a monocamada celular fixada com metanol e os corpos de inclusão evidenciados através da imunofluorescência indireta (IF), usando-se como primeiro reagente o soro de um paciente portador de linfogranuloma venéreo com elevado título de anticorpos anti-clamídea.

*U. urealyticum* — no isolamento e identificação do *U. urealyticum* (*Mycoplasma* linhagem T), inoculou-se com uma alça 0,02ml do espécime conservado em BHI no meio diferencial A7 (15), incubação em microaerofilia durante 48h e observação direta das colônias sob pequeno aumento do microscópio (100X). No meio A7 as colônias de *U. urealyticum* apre-

sentam-se com tonalidade negro-ferruginosa, facilmente diferenciáveis das colônias claras, em ovo estrelado, do *M. hominis*.

*T. vaginalis* — na detecção de *Trichomonas* empregou-se o método da cultura em meio líquido cisteína-peptona-fígado-maltose (2), incubação durante quatro dias e pesquisa do protozoário em gota pendente.

## Resultados

*C. trachomatis* — Vinte e sete (51%) de 53 portadores de UNG, pertencentes ao grupo não tratado, tiveram suas uretrites associadas à presença de corpos de inclusão de clamídeas nas monocamadas de células McCoy (Figura 1). Este índice de positividade decresceu para 33% entre os pacientes do grupo tratado ( $p < 0,05$ ), contra apenas um caso (3%) encontrado no grupo controle (Tabela 1).

Figura 1 — Células McCoy inoculadas 48h antes com espécime uretral positivo para *C. trachomatis*; corpos de inclusão evidenciados pela IF (400X)

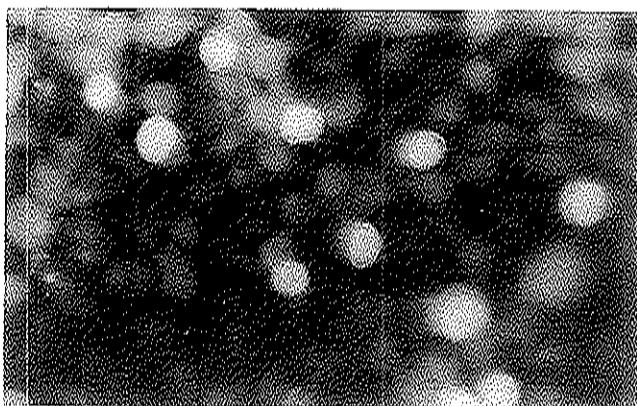


Tabela 1 — Etiologia de uretrites não gonocócicas no Recife

Grupo	Nº de pacientes	Chlamydia	Ureaplasma	Trichomonas	Negativos
Não tratado	53	27 (51)	24 (45)	1 (2)	9 (17)
Tratado	91	30 (33)	32 (35)	4 (4)	34 (37)
Controle	31	1 (3)	9 (29)	1 (3)	20 (65)

Nota: No grupo não tratado *Chlamydia* e *Ureaplasma* foram simultaneamente encontrados 8 vezes e no grupo tratado 9 vezes. Os números entre parênteses referem-se aos percentuais.

*U. urealyticum* — Ureplasmas foram isolados de 24 (45%) dos pacientes do grupo não tratado, de 32 (35%) dos pacientes do grupo tratado e de 9 (29%) dos 31 indivíduos controle. A análise estatística desses dados mostrou que não houve diferença significativa, no que concerne à ocorrência de ureplasmas, entre os três diferentes grupos investigados ( $p > 0,05$ ). Em oito pacientes do grupo não tratado e em nove pacientes do grupo tratado, *U. urealyticum* e *C. trachomatis* estavam juntos. Portanto, considerando apenas os portadores de UNG clamídea-negativos *U. urealyticum* esteve presente em 39 (45%) dos 87 casos, enquanto entre pacientes clamídea-positivos apenas 17 (30%) de 57 forneceram culturas positivas de ureplasmas ( $p < 0,05$ ).

*T. vaginalis* — Apenas um paciente (2%) do grupo não tratado estava infectado pelo tricomonas, percentual de positividade praticamente idêntico ao encontrado no grupo controle (3%) e nos portadores de UNG previamente tratados (4%).

## Discussão

Os presentes resultados confirmam observações, realizadas em outros locais, indicando *C. trachomatis* como o microrganismo mais freqüentemente associado à etiologia das UNG. Seus percentuais de ocorrência, na maioria dos estudos epidemiológicos realizados, variam entre 30 e 58% (6, 11, 12, 16, 19). Portanto, os índices obtidos no Recife, em se considerando apenas os pacientes do grupo não previamente tratado, situam-se entre os de maior faixa de freqüência. A simples comparação desses números, com os fornecidos pelos pacientes do grupo tratado, mostra a significativa influência que o uso prévio de antimicrobianos tem sobre as taxas de positividade das culturas de clamídeas. Outro fator que contribuiu para o sucesso na detecção de *C. trachomatis*, foi o emprego da IF na evidenciação dos corpúsculos de inclusão. Estudos comparativos, realizados neste laboratório, mostraram que a IF detecta 1,3 vezes mais casos positivos que a coloração pela iodina, além de evidenciar um maior número de corpos de inclusão.

A indiscutível capacidade patogênica da *C. trachomatis* na conjuntiva ocular, associada à sua elevada taxa de isolamento de casos de UNG, quando comparada a grupos controle, contribuiu de maneira decisiva para a unânime opinião de considerar-se aquele microrganismo como o principal agente etiológico das UNG. Todavia, em aproximadamente metade dos casos não é possível isolar *C. trachomatis* e a busca para encontrar outros agentes, que possam ser responsabilizados etiologicamente pelas UNG clamídea-negativas, tem sido incessante. O grande problema reside no fato de que tais microrganismos, candidatos a agentes etiológicos das UNG clamídea-negativas, estão presentes em uretras sadias em percentuais aproximados aos observados nos casos de UNG. *Hemophilus vaginalis*, *Streptococcus* grupo B, leveduras (16), bactérias anaeróbias (4) e *U. urealyticum* (20) são alguns dos vários microrganismos investigados. Entre eles, entretanto, apenas *U. urealyticum* tem recebido suficiente suporte clínico e experimental para credenciá-lo como provável agente etiológico de UNG. As avaliações terapêuticas com drogas capazes de diferenciar entre infecções por clamídeas e ureaplasmas (1,3) e a autoinoculação intrauretral de humanos (17) tiveram grande influência na aceitação do *U. urealyticum* como potencialmente patogênico, apesar de sua elevada freqüência em uretras normais (8,20) e gonorréicas (8,9).

Atualmente, existe certa tendência em se responsabilizar o *U. urealyticum* pelos casos de UNG clamídea-negativos, dos quais ele é isolado. Isso porque, o microrganismo foi mais freqüentemente encontrado na ausência que na presença de clamídea (1,21). Contudo, aquela opinião não é unânime (18). Neste trabalho, *U. urealyticum* foi mais encontrado nos casos de UNG clamídea-negativos que nos casos clamídea-positivos; diferença estatisticamente significativa. Por outro lado, ao contrário dos dados obtidos por Shepard (14), não se observou diferença significativa entre os números de isolamento do ureaplasma nos grupos controle e de UNG tratados ou não, em concordância com observações anteriores (8,20). Na realidade, é muito difícil, em se considerando apenas o caráter freqüência relativa, tentar estabelecer o papel etiopatogênico de microrganismos, para determinadas mucosas, quando eles fazem parte de sua flora indígena.

Durante muito tempo, devido à facilidade de detecção, julgou-se erroneamente que *T. vaginalis* seria importante causa de UNG. Essa falsa impressão logo foi modificada quando os métodos de isolamento de *Chlamydia* e *Ureaplasma* foram suficientemente simplificados, para o uso rotineiro no diagnóstico microbiológico das uretrites. Na presente investigação, os baixos índices de isolamento do protozoário confirmam a opinião de muitos autores sobre sua irrisória participação na etiologia de UNG (6,17). Em consonância com

essas observações, sugeriu-se que a pesquisa de *T. vaginalis* fosse tentada apenas nos raros casos de UNG que não respondem ao tratamento pelas tetraciclínas (7).

Embora tenha sido possível encontrar um agente potencialmente patogênico na maioria dos casos de UNG não tratadas, muitas uretrites permaneceram sem etiologia definida. Se esses casos, são devidos à linhagens muito exigentes dos microrganismos investigados, ou se a outros agentes microbianos não considerados no estudo, é problema longe de solução.

## Referências Bibliográficas

1. Bowie, W.R.; Alexander, E.R.; Floyd, J.F.; Holmes, J.; Miller, Y. & Holmes, K.K. — Differential response of chlamydial and ureaplasma-associated urethritis to sulphafurazole (sulfisoxazole) and aminocyclitols. *Lancet*, 2:1276-1278, 1976.
2. Carneri, I.; Emanueli, A. & Signorelli, I. — Efficiency of microscopic examination of fresh smears and cultures in diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 100:299-301, 1968.
3. Coufalik, E.D.; Taylor-Robson, D. & Csonka, G.W. — Treatment of non-gonococcal urethritis with rifampicin as a means of defining the role of *Ureaplasma urealyticum*. *Br. J. Vener. Dis.*, 55:36-43, 1979.
4. Hallén, A.; Rydén, A.C.; Schwan, A. & Wallin, J. — The possible role of anaerobic bacteria in the etiology of non-gonococcal urethritis in men. *Br. J. Vener. Dis.*, 53:368-371, 1977.
5. Harkness, A.H. — Nongonococcal urethritis. Edinburgh, E & S Livingstone, 1950.
6. Holmes, K.K.; Hardsfield, H.H.; Wang, S.P.; Wentworth, B.B.; Anderson, J.B. & Alexander, E.R. — Etiology of nongonococcal urethritis. *N. Eng. J. Med.*, 292:1199-1205, 1975.
7. Kaufman, R.E. & Wiesman, P.J. — Current concepts: non-specific urethritis. *N. Engl. J. Med.*, 291:1175-1177, 1974.
8. Lee, H.Y.; Rosner, B.; Alpert, S.; Fiumara, J. & McCormack, M.W. — Clinical and microbiological investigation of men with urethritis. *J. Inf. Dis.*, 138:798-803, 1978.
9. Magalhães, M.; Véras, A. & Numeriano, L. — T-Strain of *Mycoplasma* in abacterial urethritis. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 3:169-171, 1972.
10. Oriel, J.D.; Reeve, P.; Wright, J.T. & Owen, J. — Chlamydial infection of the male urethra. *Br. J. Vener. Dis.*, 52:46-51, 1976.
11. Perroud, H.M. & Miedzybrodzka, K. — Chlamydial infection of the urethra in men. *Br. J. Vener. Dis.*, 54:45-49, 1978.
12. Reeve, P.; Owen, J. & Oriel, J.D. — Laboratory procedures for the isolation of *Chlamydia trachomatis* from the human genital tract. *J. Clin. Path.*, 28:910-914, 1975.
13. Root, T.E.; Edwards, L.D. & Spengler, P.J. — Nongonococcal urethritis: a survey of clinical and laboratory features. *Sex. Transm. Dis.*, 7:59-65, 1980.
14. Shepard, M.C. — Nongonococcal urethritis associated with human strains of "T" mycoplasmas. *J.A.M.A.*, 211:1335-1340, 1970.
15. Shepard, M.C. & Lunceford, C.D. — Differential agar medium (A7) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (human T mycoplasma) in primary cultures of clinical material. *J. Clin. Microbiol.*, 3:613-625, 1976.
16. Swartz, S.L.; Kraus, S.J.; Herrmann, K.L.; Stargel, M.D.; Brown, W.J. & Allen, S.D. — Diagnosis and etiology of nongonococcal urethritis. *J. Inf. Dis.*, 138:445-454, 1978.
17. Taylor-Robinson, D. — Possible role of ureaplasmas in nongonococcal urethritis. In: — Hobson, D. & Holmes, K.K., eds. — Nongonococcal Urethritis and related infections. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p.30-37, 1977.
18. Taylor-Robinson, D.; Evans, R.T.; Coufalik, E.D.; Prentice, M.J.; Munday, P.E.; Csonka, G.W. & Oates, J.K. — *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in chlamydial and non-chlamydial nongonococcal urethritis. *Br. J. Vener. Dis.*, 55:30-35, 1979.
19. Terho, P. — *Chlamydia trachomatis* in non-specific urethritis. *Br. J. Vener. Dis.*, 54:251-256, 1978.
20. Viarengo, J.; Hebrant, F. & Piot, P. — *Ureaplasma urealyticum* in the urethra of healthy men. *Br. J. Vener. Dis.*, 56:169-172, 1980.
21. Wong, L.J.; Hines, P.A.; Brasher, M.D.; Rogers, G.T.; Smith, R.F. & Schachter, J. — The etiology of nongonococcal urethritis in men attending a venereal disease clinic. *Sex. Transm. Dis.*, 4:4-8, 1977.

## Influenza surveillance in Rio de Janeiro: a serological study

José Roberto Salcedo Chaves  
Jussara Pereira do Nascimento

*Instituto Oswaldo Cruz, Centro de Virologia Comparada, Caixa Postal 926  
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil  
& Marguerite Scott Pereira  
Virus Reference Laboratory, Colindale, London*

### Summary

Antibody against three *influenza A* viruses which have circulated in the world in recent years were estimated in serum samples collected between 1976 and 1980 in Rio de Janeiro. Antibody to A/Victoria/75 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) was found in a high proportion in 1976, the year after its first appearance, whereas antibody to A/Texas/77 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) was infrequent and there is little evidence that this virus circulated to any extent. Antibody to A/USSR/90/77 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) was almost entirely absent in sera from persons under 20 years of age in 1976 and 1977. In 1978 half the sera had antibody and in 1980 only 40% were without some detectable antibody, indicating considerable, presumably unnoticed, spread in the community.

### Resumo

#### *Vigilância de influenza no Rio de Janeiro: estudo sorológico*

Inquérito sorológico para determinação de anticorpos para três amostras de vírus influenza A que circularam no mundo durante os últimos anos, foi realizado com espécimes coletados no Rio de Janeiro de 1976 a 1980. Anticorpos para A/Victoria/3/75 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) foram encontrados em maior proporção durante 1976, um ano após o seu aparecimento. A freqüência de detecção de anticorpos para A/Texas/1/77 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) foi muito baixa, havendo pouca evidência de que este vírus tenha circulado amplamente. Anticorpos para A/USSR/90/77 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) estavam ausentes em soros de pessoas menores de 20 anos de idade em 1976 e 1977. Em 1978, metade dos soros apresentaram anticorpos detectáveis, e em 1980 somente 40% não apresentaram, indicando considerável disseminação deste vírus, embora não tenha sido detectado na comunidade.

### Introduction

The international surveillance of *influenza* has been established now for nearly 40 years with the objectives of gathering information on the disease wherever it occurs in the world and on the viruses associated with it. Vaccination against *influenza* has not been as successful as vaccination against some other virus diseases such as smallpox, poliomyelitis and measles which can be controlled or, as in the case of smallpox,

eliminated. *Influenza* virus has a characteristic which has made such control difficult. This is its property of changing its surface antigens either partially or, at longer intervals, completely, with the creation of new sub-types against which immunity built up by previously circulating viruses is ineffective. It has, so far, been impossible to predict with certainty when such major changes will occur or where in the world viruses showing these alterations will appear. The minor changes are probably occurring all the time in every country and although important from the point of view of maintaining the viruses in circulation, epidemiologically have not usually such a formidable impact.

The failure of *influenza* vaccines to control the epidemic spread of the disease has been recognized but the need for vaccines is none the less considerable. In certain situations, such as in industry and among military groups vaccine will prevent massive absenteeism through illness and in the pandemic situation its use is recommended to preserve essential services such as communications and transport. Besides this the disease itself, while mild in the healthy child or adult, can be severe in older persons and in infants and epidemics are accompanied by increased numbers of deaths in these age groups beyond the normal threshold for the time of year.

For all these reasons it is important that information on *Influenza* should be available, internationally for the virus itself and nationally in order that Health Authorities are aware of the problem and can take the necessary steps in the face of a pandemic which spares nobody in any country of the world.

The way *influenza* surveillance is tackled in each country varies according to the facilities available. The World Health Organization already has recognized and gives support to over one hundred laboratories in some 70 countries. These national centres have the task of detecting *influenza* viruses in the community, identifying them as far as they are able with reagents supplied by WHO and sending any viruses isolated to one of the two international *influenza* centres, in Atlanta, USA, serving the Americas and in London, UK, serving other parts of the world.

Besides the search for *influenza* viruses, if national statistics on morbidity and mortality are available such data are collected and analysed to give information on the epidemic waves as they occur. The sort of statistics which may be used are mortality figures, either total, or deaths attributed to *influenza* or pneumonia, and morbidity figures which may be derived where sickness benefit schemes exist or from records of absences in large industries or public services such as the Post or Transport. Where such figures are collected centrally it is possible to follow an *influenza* epidemic from its onset to its peak and decline. Where statistics are not easily available laboratory methods may be used to gather information on the impact of influenza on the community. One of these methods is to collect and store serum samples from all ages of the population at regular intervals year by year. The examination of the antibody content of such sera against the *influenza* viruses known to circulating in the world may show a significant increase in the proportion with antibody from one year to the next demonstrating the passage of the virus through the population and giving information on the proportion of susceptibles in the community (1). In the presence of a pandemic this may not be necessary as the impact of *influenza* is so characteristic. During inter-pandemic periods however, the virus may circulate quite undetected if a vigilant laboratory search is not maintained.

*Influenza* viruses have been isolated by several groups in Rio de Janeiro (2) and evidence presented of their clinical impact. However it seemed of interest to find out by a serum survey what effect the most recent *influenza* H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> variants have had in the last few years and of particular interest would be the evidence as to whether the H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> virus, which reappeared in the world in 1977 in China after a gap of twenty years, had reached this area. The spread world-wide had followed as expected but information on its appearance and the extent of its spread in South America has been scanty.

This report describes the findings of a serum survey of antibody to recent strains of *influenza* A H<sub>3</sub>N<sub>2</sub> viruses and to the H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> virus, using serum samples collected in Rio de Janeiro between the years of 1976 and 1980.

## Material and Methods

Serum samples were obtained from various sources. Specimens taken in 1976, 1977 and 1978 were kindly supplied by Dr. Gilda Bruno-Lobo. Those selected were from persons under the age of 20 years with the specific objective of matching the antibody present before the reappearance of the H<sub>3</sub>N<sub>1</sub> virus in the world in 1977 with antibody found in sera taken in 1980. The sera had all been stored frozen at -20°C. Sera from persons of all ages were kindly given by Dr. Clara F. Tachibana Yoshida and Dr. G. Deane.

Sera were treated with receptor-destroying enzyme and tested by haemagglutination-inhibition (HI) by a standard microtitre procedure.

The viruses used in HI tests were A/Victoria/3/75 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>), A/Texas/1/77 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) and A/USSR/90/77 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) or A/Brasil/11/78 (H<sub>1</sub>N<sub>1</sub>) obtained from the WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza, Colindale, London.

## Results

Two recent variants of the A/Hong Kong/1/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) virus were selected for antibody tests. These were A/Victoria/3/75, which appeared in the Far East in the middle of 1975 and spread round the world causing epidemics with considerable consequences in both morbidity and mortality; and another variant, A/Texas/1/77, which circulated together with A/Victoria/3/75 for two years before becoming the predominant virus world-wide in 1977.

Table 1 gives the proportion of sera tested which showed antibody to A/Victoria/3/75 in the years from 1976 to 1980. In sera collected from children and young adults during 1976 antibody was already detected in well over half those tested. The proportion remained much the same in sera collected in 1977 and 1979. However of the sera collected in 1980 the proportion of sera without detectable antibody had increased from a quarter to a half of those tested and the proportion with high titres had fallen from 50% to only 17%. Of the large number of sera found negative in 1980 most were from children under the age of 3 years.

Table 1 -- HI titres against A/Victoria/3/75 in sera from persons under 20 years of age

Year	Percentage at each titre			Number sera tested
	< 10	10 - 20	≥ 40	
1976	33	10	57	21
1977	25	16	59	51
1979	24	24	51	45
1980	47	45	17	109

Table 2 shows the pattern of antibody in the same sera to the A/Texas/77 virus. This virus is antigenically close to another variant of the A/Hong Kong/68 (H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>) virus originally identified as A/England/864/75. This virus appeared in the UK shortly before the A/Victoria/75 and circulated throughout the winter without causing more than small outbreaks and sporadic cases. The A/Victoria/75 by contrast was responsible for severe and widespread epidemics. Viruses antigenically similar to A/England/864/75 were isolated at that time from a few other countries such as France, Portugal and Jamaica. It appears from our results that this variant may quite possibly have circulated in Brazil during that

**Table 2 — HI titres against A/Texas/1/77 in sera from persons under 20 years of age**

Year	Percentage at each titre			Number sera tested
	< 10	10 - 20	≥ 40	
1976	76	10	14	21
1977	62	30	8	50
1978	62	32	6	108
1979	74	23	2	43

period as a small but significant number of sera have titres of  $\geq 40$ . In sera taken in subsequent years the number with such titres progressively declined suggesting the virus did not return to this area despite the evidence that in the USA it was responsible for widespread *influenza* during 1977.

The re-appearance of the H<sub>3</sub>N<sub>1</sub> virus in China 1977 was followed by spread throughout the world during the early months of 1978. By March it was identified in the Canal Zone and in April found to be causing an epidemic in Argentina. The H<sub>3</sub>N<sub>1</sub> virus was not reported in Brazil until early 1979 when it was isolated from an outbreak in Belem. From the results of our HI tests as shown in Table 3 it seems likely that the H<sub>3</sub>N<sub>1</sub> virus was probably circulating in Rio de Janeiro before that time as sera taken in late 1978 show evidence of infection with low titres in half of the sera and with high titre in a few whereas in sera taken in 1976 and 1977 antibody was largely absent. The results on sera taken in 1979 suggest that the virus continued to circulate and in 1980 two thirds of the sera have antibody.

**Table 3 — HI titres against A/USSR/90/77 in sera from persons under 20 years of age**

Year	Percentage at each titre			Number sera tested
	< 10	10 - 20	≥ 40	
1976	97	1	1	68
1977	100	0	0	35
1978	50	47	3	109
1979	67	22	11	45
1980	39	50	11	108

## Discussion

This method of retrospective analysis of antibody profiles demonstrates the way evidence on the circulation of *influenza* viruses in the community can be obtained. The finding of frequent antibody to A/Victoria/3/75 in the sera taken in 1976 is supported by the evidence presented by Marques & col. (2) of the isolation of several strains of this virus from children admitted to hospital with acute respiratory illness during the period March to September 1976. Within a sub-type such as H<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, cross-reacting antibody between variants does not allow a precise identification of which viruses circulate but had, for example, A/Texas/77 been widespread, antibody would certainly have been more apparent than has been found in our tests.

The change in the pattern of H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> antibody is particularly striking in that in sera taken in 1976 and 1977, before the virus reappeared, antibody was absent except in two serum samples. These two sera continued to react in the HI tests on repeated testing after fresh treatment with RDE. No explanation can be offered for this finding although it is interesting that the ages of the persons were 18 and 16 giving their birth at 2 and 4 years after the apparent disappearance of the original H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> virus.

It is clear that *influenza* viruses of one kind or another have circulated regularly in Rio de Janeiro following a pattern shown in other countries.

It would be interesting to know what the seasonal incidence has been and what effect the infections have had on morbidity and mortality. It is hoped that continued surveillance along these lines coupled with virus isolation will in time answer these questions.

## References

1. Candeias, J.A.N. & Pereira, M.S. — The measurement by serological means of the impact of the Hong Kong/68 *influenza* virus on a population. Rev. Saude Publica (S. Paulo), 6:85, 1972.
2. Marques, A.N.; Machado R.D.; de Andrade, T.V.M.; de Carvalho Ono, I.D. & Sobral, M.T.C. — Viroses respiratórias em crianças na cidade do Rio de Janeiro. J. Ped., 44:345-348, 1978.

## Sensibilidade de diferentes linhagens celulares na detecção de enterovírus humanos presentes em águas

Maria Therezinha Martins

Laurinda A. Soares

Antonia Guedes Molina

CETESB, Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345  
05459 São Paulo SP, Brasil

& Edda de Rizzo

Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500  
05504 São Paulo SP, Brasil

### Resumo

Duas linhagens celulares de origem simia (LLC-MK<sub>2</sub> e BS-C-1) e duas de origem humana (HeLa e HEp<sub>2</sub>-C) foram testadas quanto à sensibilidade a enterovírus humanos. Culturas celulares da mesma linhagem, a LLC-MK<sub>2</sub>, obtidas de dois laboratórios diferentes, quando cultivadas sob as mesmas condições mostraram diferenças quanto à sensibilidade a enterovírus isolados de esgoto. Células HeLa, inoculadas com poliovírus tipo II-MEF, apresentaram efeito citopático, quando cultivadas em meio líquido; porém mostraram-se inadequadas para a formação de placas (UFP), quando cultivadas sob meio gelificado. Quando poliovírus tipo I-Mahoney, adicionado a água tratada e de manancial, posteriormente submetidas a concentração, foi inoculado paralelamente, em células BS-C-1 e LLC-MK<sub>2</sub>, as primeiras se mostraram mais suscetíveis, para a recuperação desse vírus. Com linhagens de células de rim de macaco foram obtidos melhores índices de recuperação de vírus do que com linhagens de origem humana, tendo a BS-C-1 apresentado os melhores índices de plaqueamento e podendo, pois, ser considerada como linhagem ideal, dentre aquelas empregadas no estudo.

### Summary

*Sensitivity of cell strains for detection of human enteroviruses present in water*

Cell lines of simian origin (LLC-MK<sub>2</sub> and BS-C-1) and two human cell lines (HeLa and HEp<sub>2</sub>-C) had their sensitivity tested for the detection of enteroviruses. Cell cultures of the LLC-MK<sub>2</sub> line, obtained from two different laboratories, differed in their relative sensitivity to enteroviruses isolated from sewage when cultivated under the same conditions. HeLa cells infected with type II-MEF poliovirus showed a cytopathic effect when cultivated in fluid medium, but failed to produce plaques (PFU) under agar overlay. When type I-Mahoney poliovirus, added to treated water and wastewater and later recovered by concentration, was inoculated into BS-C-1 and LLC-MK<sub>2</sub> lines, the former were found to be more susceptible for virus recovery. Higher recovery rates were reached with lines of simian origin (monkey kidney cells) than with cell lines of human origin; the BS-C-1 line gave the best response to viral replication, being considered the cell line of election in this study.

## Introdução

Culturas de células são hospedeiros práticos e econômicos que podem substituir animais de laboratório nos isolamentos de vírus, testes sorológicos e preparação de antígenos vírais (19, 23). Sua utilização, no diagnóstico virológico, possibilitou a descoberta de vários tipos de vírus que infectam o homem. A maioria delas pode ser usada na detecção e isolamento de vírus, mas como cada linhagem apresenta características distintas de multiplicação, conforme foi demonstrado por vários autores (2, 9, 13, 16, 17, 19, 21, 25), considera-se, como linhagem celular ideal, aquela que permite a recuperação da maioria dos agentes virais presentes no espécime em estudo.

É fato devidamente comprovado que o homem elimina mais de 1.000.000 de partículas de vírus por grama de fezes, quer esteja ele doente ou com infecção subclínica. Desse modo, vários vírus são encontrados nos esgotos, especialmente os enterovírus, por serem mais resistentes a condições adversas do meio ambiente. Vírus Coxsackie, ECHO e pólio têm sido consistentemente isolados de esgotos, por vários autores. A descarga direta, de esgotos contaminados, em rios ou no mar pode levar à infecção do homem, o que torna a pesquisa de vírus humanos em esgotos e outras águas condição indispensável para a proteção da saúde da população (26).

Problemas especiais, associados com a detecção dos vírus são: sua baixa concentração nas águas, o que leva à necessidade de se concentrar grandes volumes de água; as várias impurezas suspensas na água, que interferem com os processos de concentração; a inexistência de um só sistema hospedeiro, universal, para todos os vírus entéricos, notadamente o vírus da hepatite A, os rotavírus humanos, os vírus Coxsackie A e os vírus Norwalk da gastroenterite (1).

Este trabalho tem como objetivo a avaliação da sensibilidade de diferentes linhagens celulares, tanto na recuperação de enterovírus-padrão, como na de enterovírus desconhecidos, eventualmente presentes em amostras de água submetidas a análises de rotina.

## Material e Métodos

*Linhagens celulares* — Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: a) LLC-MK<sub>2</sub>, obtida de rim de macaco Rhesus adulto (*Macaca mulatta*) por Hull & col. (15) e proveniente de dois laboratórios: Instituto Adolfo Lutz (IAL) e Instituto Butantan (IB); b) BS-C-1, derivada de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), por Hopps & col. (14); c) HEp<sub>2</sub>-C, obtida originalmente por Moore & col. (20), a partir de tecido carcinomatoso de laringe humana; d) HeLa, estabelecida por Gey & col. (12), a partir de tecido carcinomatoso de cérvix humana.

*Meios de cultura* — Para promover a multiplicação celular, foi utilizado o meio Eagle mínimo essencial desidratado (Flow Laboratories), em solução salina balanceada de Earle, acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado (4). Para o plaqueamento em agar, foi utilizado o meio gelificado de Dulbecco, composto de meio Eagle (2x), soluções de sais, soro fetal bovino, agar Noble e corante vital (vermelho neutro), pH 7,2, que foi sobreposto às camadas celulares, inoculadas com a amostra (5, 10, 11).

*Amostras de água* — Foram estudadas amostras de: a) água tratada — oito amostras de 200l foram coletadas na torneira do laboratório e contaminadas artificialmente com vírus pólio tipo I-Mahoney. Posteriormente, foram submetidas a concentração, utilizando-se equipamento especial (1,6); b) água de manancial — quinze amostras de 40l foram contaminadas artificialmente e logo após concentradas, tendo sido adotado o mesmo método empregado para a água tratada, após terem sido colhidas em uma estação de tratamento de água (ETA) de São Paulo; c) esgoto — cinco amostras de 1l de esgoto bruto, colhidas na

Estação de Tratamento de Esgoto da SABESP (ETE), foram concentradas segundo método já descrito (6).

*Amostras de vírus* — Nos testes em que as amostras de água foram contaminadas artificialmente, foram usadas as cepas de vírus pólio II-MEF e I-Mahoney, cedidas pelo NCDC (National Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, USA).

*Métodos de concentração* — Foram submetidas à concentração amostras de: a) águas de manancial e tratada que, após contaminação artificial com vírus pólio tipo I-Mahoney tiveram seu volume reduzido para cerca de 15ml por reconcentração em membranas filtrantes (1, 6). A cepa Mahoney foi selecionada por produzir placas (UFP — unidades formadoras de placas) em meio gelificado, 18-24 horas após sua inoculação, o que possibilitou sua diferenciação das placas formadas por enterovírus eventualmente presentes nas amostras de água em teste; b) águas de esgoto, concentradas pela técnica de adsorção a membranas filtrantes (1, 5, 6) e reconcentradas por hidroextração frente a polietileno glicol (1, 27).

*Inoculação das amostras de vírus* — Antes de serem inoculadas, as amostras concentradas foram testadas quanto: a) à esterilidade, pela inoculação de 0,5 a 1,0ml em cada um de cinco tubos contendo 15ml de caldo de soja (Tryptic soy broth) (7); b) à citotoxicidade, pela inoculação de 0,1ml de amostra por tubo, simultaneamente à sua semeadura com a suspensão celular. As amostras que foram incluídas neste estudo foram trabalhadas em três etapas: a) com aproximadamente 100 UFP de vírus pólio tipo II-MEF, foram inoculadas 30 garrafas de culturas confluentes de cada uma das linhagens: BS-C-1, LLC-MK<sub>2</sub> (IAL), HEp<sub>2</sub>-C e HeLa; b) com 15 amostras de água de manancial e oito amostras de água tratada, artificialmente contaminadas com concentrações conhecidas de vírus pólio tipo I-Mahoney (70-100 UFP por amostra, aproximadamente) e submetidas posteriormente a processos de reconcentração de vírus, foram inoculadas 10 garrafas de culturas BS-C-1 e 10 de LLC-MK<sub>2</sub> (IAL); c) com cinco amostras de esgoto bruto, concentradas para a detecção de vírus normalmente ocorrentes, foram inoculadas 10 garrafas de cada uma das seguintes células: BS-C-1, LLC-MK<sub>2</sub> (IAL), LLC-MK<sub>2</sub> (IB) e HEp<sub>2</sub>-C. Após a inoculação, as culturas foram incubadas durante uma hora a 35°C, com rotação periódica para a distribuição do inóculo sobre as monocamadas. A seguir, 5ml de meio gelificado foram adicionados a cada garrafa e as culturas foram reincubadas a 35°C, no escuro, durante 14 dias, efetuando-se leituras diárias para acompanhar o aparecimento de placas (10). Assim que se tornava claramente visível, cada placa era transferida imediatamente para tubos com células, a fim de confirmar sua natureza viral.

## Resultados

Na Tabela 1, encontram-se os resultados obtidos nos testes de inoculação de vírus pólio tipo II-MEF em quatro linhagens celulares: BS-C-1, LLC-MK<sub>2</sub> (IAL), HEp<sub>2</sub>-C e HeLa. As células BS-C-1 foram as que proporcionaram a melhor recuperação, com a média de 105 UFP. Nas culturas de células HeLa, não foram obtidas unidades formadoras de placas.

A Tabela 2 apresenta os dados obtidos no teste em que a sensibilidade das células BS-C-1 e LLC-MK<sub>2</sub> (IAL) foi comparada frente a amostras concentradas de águas tratadas (oito amostras) e de manancial (15 amostras), artificialmente contaminadas com vírus pólio tipo I-Mahoney. Confirmado os resultados da Tabela 1, a linhagem BS-C-1 apresentou melhor desempenho na recuperação dos vírus, excetuando-se as amostras de água de manancial números 12 a 15.

**Tabela 1** — Unidades formadoras de placas (UFP) obtidas pela inoculação de vírus pólio tipo II-MEF em linhagens celulares

Linhagens celulares	Média de UFP
BS-C-1	105
LLC-MK <sub>2</sub> (IAL)*	49
HEP <sub>2</sub> -C	22
HeLa	0

\* IAL — Linhagem cedida pelo Instituto Adolfo Lutz.

**Tabela 2** — Recuperação de vírus pólio tipo I-Mahoney de amostras de águas artificialmente contaminadas

Tipo de água	Número de amostras	Média de UFP	
		BS-C-1	LLC-MK <sub>2</sub> (IAL)
Tratada	1	28	12
	2	64	30
	3	03	0
	4	37	09
	5	33	07
	6	25	10
	7	32	08
	8	03	0
Manancial	1	38	22
	2	29	14
	3	43	15
	4	49	20
	5	38	17
	6	28	24
	7	71	21
	8	46	09
	9	45	10
	10	37	07
	11	43	08
	12	65	79
	13	46	57
	14	53	65
	15	0	65

**Tabela 3** — Unidades formadoras de placas (enterovírus desconhecidos) obtidas de amostras de esgoto bruto

Amostra	Média de UFP			
	BS-C-1	LLC-MK <sub>2</sub> (IAL)*	LLC-MK <sub>2</sub> (IB)**	HEP2-C
A	33	24	22	02
B	30	27	10	10
C	38	20	09	0
D	19	19	05	01
E	35	38	22	08

\* IAL — Linhagem cedida pelo Instituto Adolfo Lutz (81.<sup>a</sup> passagem).

\*\* IB — Linhagem cedida pelo Instituto Butantan (122.<sup>a</sup> passagem).

Nos testes em que cinco amostras concentradas de esgoto bruto foram inoculadas paralelamente nas linhagens BS-C-1, LLC-MK<sub>2</sub> (IAL), LLC-MK<sub>2</sub> (IB) e HEp<sub>2</sub>-C (Tabela 3), verificou-se que médias mais elevadas de unidades formadoras de placas foram obtidas com as células BS-C-1. No que se refere às duas linhagens de LLC-MK<sub>2</sub>, procedentes de laboratórios diferentes e com número de passagens diferentes, a LLC-MK<sub>2</sub> (IAL) mostrou-se mais sensível do que a LLC-MK<sub>2</sub> (IB). A linhagem HEp<sub>2</sub>-C foi a que apresentou a menor sensibilidade aos vírus presentes nas amostras submetidas a plaqueamento.

## Discussão

No isolamento e identificação de enterovírus humanos, atualmente são usados vários tipos de células, incluindo as de cultivos primários e de linhagens estabelecidas. É sabido que certas células são sensíveis a determinados vírus e resistentes a outros e que sublinhagens e clones podem apresentar sensibilidade diferente daquela revelada pelas células parentais. Castro & Pisani (3) verificaram que certos clones derivados da linhagem IB-RS-2 eram mais sensíveis ao vírus da febre aftosa, permitindo detectar cerca de três vezes mais partículas de vírus do que outros. Ao utilizar quatro partidas diferentes de células HeLa, recebidas de um mesmo fornecedor, em épocas distintas, Scherer (22) observou que elas responderam atípicamente aos vírus pólio e Coxsackie, quando comparadas com uma amostra original da mesma célula, e que alterações morfológicas das células acompanhavam essas modificações de sensibilidade ao vírus. Leidy & col. (18) fizeram a mesma observação, quanto à variação de sensibilidade ao poliovírus, existente entre clones de células HeLa.

Alguns resultados, obtidos neste estudo, confirmam as observações relatadas. Em meio líquido, as células HeLa apresentaram efeito citopático (ECP) típico, mas sob meio gelificado mostraram-se inadequadas para a formação de placas (Tabela 1). Leidy & col. (18) relataram a mesma observação, referindo que a intensidade das mudanças, em algumas situações, chegou a provocar a interrupção dos estudos em que as células estavam sendo empregadas. Esse comportamento pode ser explicado pela ocorrência de seleção de células variantes, que se mostraram incapazes de incorporar o vermelho neutro adequadamente, de modo a permitir a evidenciação de placas. Schmidt & col. (26) relataram que um certo número de echovírus, capazes de causar ECP em meio líquido, não produziram UFP sob meio gelificado, no mesmo tipo de células. Uma outra possibilidade é a de essas células não mais serem semelhantes às HeLa originais. Sendo uma das células mais intensamente usadas em virologia, uma eventual contaminação com outras células não seria improvável. Convém lembrar que uma célula, contaminando outra e sobrepujando-a em número, devido a uma taxa de multiplicação mais rápida, é fenômeno bem mais frequente do que se poderia supor (21).

Das quatro linhagens celulares testadas (LLC-MK<sub>2</sub>, BS-C-1, HEp<sub>2</sub>-C e HeLa), a que se mostrou mais sensível ao isolamento de enterovírus foi a BS-C-1, o que está em concordância com os resultados obtidos por Schmidt & col. (25) os quais, principalmente em isolamento de vírus pólio, ECHO e Coxsackie, concluíram que a BS-C-1 apresentou o mesmo grau de sensibilidade das células primárias de rim de macaco Rhesus.

Quanto às duas sublinhagens da LLC-MK<sub>2</sub>, a proveniente do Instituto Adolfo Lutz revelou maior sensibilidade ao isolamento de enterovírus desconhecidos, presentes em amostras de esgotos, do que a procedente do Instituto Butantan, tendo fornecido um número aproximadamente duas vezes maior de UFP (Tabela 3). É possível que condições diferentes de manutenção das células e que o maior número de passagens da linhagem IB tenham provocado a seleção de células que eram menos sensíveis ao vírus. Não se sabe ao certo em que consistem essas alterações que afetariam a sensibilidade celular aos vírus. Darnell & Sawyer (8), verificando esse fenômeno, estudaram a sensibilidade de duas sublinhagens da HeLa ao poliovírus tipo I-Mahoney e constataram que as células resistentes

adsorviam as partículas de vírus do mesmo modo que as células sensíveis. Todavia, o RNA do vírus não era liberado com a mesma eficiência pelas células resistentes.

Fica evidenciada, pelo presente estudo, a obrigatoriedade de se conferir periodicamente, o grau de sensibilidade, apresentado pelas células usadas em testes de rotina, frente a um vírus-padrão. Quaisquer alterações morfológicas detectadas nas células, tais como alongamento ou granulação, ou a obtenção de variação no tamanho de UFP, devem ser investigadas cuidadosamente, pois podem constituir indício de que outros tipos de modificações possam estar ocorrendo concomitantemente. Dentre essas modificações podem estar a seleção de variantes resistentes ao vírus ou de variantes inadequadas ao plaqueamento em meio gelificado, o que certamente leva à não produção de unidades formadoras de placas e à conclusão errônea de que as amostras em estudo não contêm vírus, com o consequente registro de resultados falso-negativos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Angela Maria M. Faria, Roberto Chaves e Niva D. Celestino pelo serviço datilográfico.

## Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association. Standard methods for the examination of water and wastewater, Section 913. 14th ed. Washington, DC, 1976.
2. Berquist, K.R. & Love, G.J. — Relative efficiency of three tissue culture systems for the primary isolation of viruses from feces. *Hlth. Lab. Sci.*, 3:195-199, 1966.
3. Castro, M.P. & Pisani, R.C.B. — Variation on the susceptibility of cell clones derived from the IB-RS-2 swine cell line to the foot-and-mouth disease virus. *Arq. Inst. Biol. (S. Paulo)*, 34:295-229, 1967.
4. CETESB — Norma L5.501 — Preparo de culturas celulares para virologia. São Paulo, 1978.
5. CETESB — Norma L5.502 — Isolamento e quantificação de enterovírus em água. São Paulo, 1978.
6. CETESB — Norma L5.503 — Método de concentração de amostras para o isolamento de enterovírus a partir de grandes volumes de água. São Paulo, 1978.
7. Code of Federal Regulations, Food and Drugs: Parts 600 to 1299. Nat. Arch. United States, p. 37 (revised) April 1, 1977.
8. Darnell Jr., J.E. & Sawyer, T.K. — The basis for variation in susceptibility to poliovirus in HeLa cells. *Virology*, 11:665-675, 1960.
9. Davis, P.M. & Phillipotts, R.J. — Susceptibility of the Vero line of African green monkey kidney cells to human enteroviruses. *J. Hyg. (Camb.)*, 72:23-30, 1974.
10. Dulbecco, R. — Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 38:747-752, 1952.
11. Gabrielson, M.O. & Hsiung, G.D. — Sensitivity of agar overlay method for the recognition of enteroviruses. *Appl. Microbiol.*, 13:967-972, 1965.
12. Gey, G.O.; Coffman, W.D. & Kubicek, M.T. — Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12:264-265, 1952.
13. Herman, E.C. — The usefulness of human fibroblast cell lines for the isolation of viruses. *Amer. J. Epid.*, 85:200-206, 1966.
14. Hopps, H.E.; Bernheim, B.C.; Nisalak, A.; Tjio, J.H. & Smadel, J. E. — Biologic characteristics of a continuous kidney cell line derived from the african green monkey. *J. Immunol.*, 91:416-424, 1963.
15. Hull, R.N.; Cherry, W.R. & Johnson, I.S. — Readaption and maintenance of mammalian cells to continuous growth culture. *Anat. Rec.*, 124:490, 1956.
16. Kelly, S. & Sanderson, W.W. — Comparison of various tissue cultures for the isolation of enteroviruses. *Amer. J. Publ. Hlth.*, 52:455-459, 1962.

17. Lee, L.H.; Phillips, C.A.; South, M.A.; Melnick, J.L. & Yow, M.D. — Enteric virus isolation in different cell cultures. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 32:657-663, 1965.
18. Lidy, G.; Sprunt, K.; Redman, W. & Alexander, H.E. — Sensitivity of population of clonal lines of HeLa cells to polioviruses. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 102:81-85, 1959.
19. McSwiggan, D.A. & George, R. — A comparison of two cell culture systems for the primary isolation of enteric viruses. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 43:295-300, 1970.
20. Moore, A.E.; Sabachewsky, L. & Toolan, H.W. — Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells. *Cancer Res.*, 15:598-602, 1955.
21. Pal, S.R.; McQuillin, J. & Gardner, P.S. — A comparative study of susceptibility of primary monkey kidney cells, HEp<sub>2</sub> cells and HeLa cells to a variety of faecal viruses. *J. Hyg. (Camb.)*, 61:493-498, 1963.
22. Scherer, W.F. — Comparative susceptibility of cells of the same type to infection by poliomyelitis virus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 61:806-821, 1955.
23. Schmidt, N.J. — Tissue culture in the laboratory diagnosis of viral infections. *Am. J. Clin. Pathol.*, 57:820-828, 1972.
24. Schmidt, N.J.; Ho, H.H. & Lennette, E.H. — Comparative sensitivity of the BGM cell line for isolation of the enteric viruses. *Hlth. Lab. Sci.*, 13:115-117, 1976.
25. Schmidt, N.J.; Lennette, E.H.; Shon, C.W. & Dennis, J. — The sensitivity of grivet monkey kidney cell line BS-C-1 for propagation and isolation of certain human viruses. *Am. J. Publ. Hlth.*, 54:1522-1530, 1964.
26. Schmidt, N.J.; Ho, H.H.; Riggs, J.L. & Lennette, E.H. — Comparative sensitivity of various cell culture systems for isolation of viruses from wastewater and fecal sample. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:487-491, 1978.
27. WHO Technical Report Series, No. 639 — Human viruses in water, wastewater and soil (Report of a WHO Expert Committee), 1979.

## Estudo de *Entamoeba gingivalis* em boca de crianças

Eva Miranda de Souza

Depto<sup>o</sup> de Micologia, Centro de Ciências Biológicas, UFPE, Cidade Universitária  
50000 Recife PE, Brasil

### Resumo

Material de cavidade oral, de 400 crianças, entre 7 a 14 anos, revelou 3% de *Entamoeba gingivalis* e ausência de *Trichomonas tenax*. O estudo envolveu crianças com mucosa oral e dentes saudáveis (controle), portadoras de alterações gengivais e portadoras de cárries dentárias. Neste trabalho procurou-se relacionar a presença de *Entamoeba gingivalis* com o pH bucal e idade dos pacientes. O autor, entre outros achados, obteve maior incidência de *E. gingivalis* em crianças com pH bucal 6,0 e idade de 7 anos.

### Summary

#### *Study of Entamoeba gingivalis on children's mouth*

In material collected from the oral cavity of 400 children from 7 to 14 years old, 3% of *Entamoeba gingivalis* were isolated and none of *Trichomonas tenax*. In the studied individuals were presents children with healthy oral tissues and teeth (control), children with gingival alterations and children with dental caries. In this work we tried to relate the occurrence of *Entamoeba gingivalis* with the oral pH, and the patients age. The author, among consulted, found more incidence of *E. gingivalis* in children with oral pH value of 6 and 7 years old.

### Introdução

Protozoários parasitas da cavidade oral de crianças têm sido pouco estudados e, no Brasil, a literatura é bastante escassa com respeito a presença da *Entamoeba gingivalis* e da *Trichomonas tenax*, devendo-se destacar os iniciadores dos estudos do grupo, no país (2, 5, 15, 20, 21). Na região, nenhum trabalho foi realizado até o momento.

A incidência da *E. gingivalis* é importante. Se o amebídeo for encontrado no escarro, poderá ser confundido com *Entamoeba histolytica*, dando-se um falso diagnóstico de amebíase das vias respiratórias (2).

*E. gingivalis* foi a primeira ameba parasita do homem, isolada da placa bacteriana que recobre o colo dentário, em 1849 (9). Embora sendo freqüente, sua ocorrência é desconhecida pela maioria dos médicos e dentistas, talvez devido à riqueza da flora bucal, e numerosas doenças da boca provocadas por bactérias, o mesmo acontecendo com *T. tenax*. Os protozoários são habitualmente encontrados em bocas com alterações patológicas, embora sejam também isolados de bocas aparentemente saudáveis, em proporções menores. São encontrados em sulcos gengivais, principalmente do tártaro dentário ou de cavidades formadas por cárries, bolsa periodontal e saliva (16), abscessos ou supurações

dentárias, como a "piorréia alveolar" (14), gengivite ulcerativa necrosante aguda ou guna (10), língua pilosa e lesões sifilíticas bucais (23) e aparelhos ortodônticos (1).

São espécies cosmopolitas e acompanham o homem em sua distribuição geográfica. Por apresentarem-se somente em suas formas de tropozitas, não necessitam de hospedeiro intermediário (1, 19, 20).

*E. gingivalis* é a mais freqüente das amebas humanas e apresenta-se geralmente associada a *Leptotrix* e a *Spirochaetes*. Jamais alcança o intestino; se deglutiida, é destruída no estômago, pelo suco gástrico; se em contato com a bile humana desintegra-se rapidamente, como observado (19, 20). Para uns *E. gingivalis* não tem ação patogênica (17), tratando-se de um comensal inofensivo da boca humana. Outros afirmam que *E. gingivalis* é patogênica mas facilmente combatida pela aplicação tópica da emetina (6) amebicida usado para o processo amebiano agudo causado por *E. histolytica*. Além de ser agente patogênico, *E. gingivalis* pode conduzir bactérias para dentro da área pericemental, embora que nem todos os casos de "piorréia alveolar" sejam de natureza amebiana ou têm a interferência da ameba (6). Alguns autores consideram que o metabolismo desse protozoário cria ambiente favorável para multiplicação de germes patogênicos (13).

É a única ameba que parasita a boca humana, de diagnóstico relativamente fácil, cuja transmissão se faz pelo contato bucal direto ou indireto (13).

Nos Estados Unidos da América do Norte, encontramos os seguintes trabalhos a cerca do assunto:

Barret (6) em pesquisas realizadas sobre protozoários da boca, em relação com a "piorréia alveolar" em 46 casos de afecções supurativas da gengiva e tecido do pericemento, após realização de exame direto e observação microscópica do conteúdo das "bolsas piorréicas", diluído numa gota de solução salina, constatou que das 46 amostras examinadas, 45 abrigavam *E. gingivalis*, ativamente móveis.

Hinshaw (11) conseguiu inocular subgengivalmente, em um cão velho com gengivite avançada, cultura contendo *E. gingivalis* e *T. tenax*, obtida de um caso de "piorréia" humana ativa; observando que ambos protozoários continuavam a se multiplicar no cão, durante 14 meses, quando o animal foi sacrificado, tendo notado mudanças patológicas, simulando "piorréia humana".

Beatman (7) examinou 350 pacientes adultos, dividindo-os em dois grupos, como segue: grupo a) colheu 100 amostras com "swabs" estéreis, umedecendo-os com saliva do paciente e friccionando abaixo da gengiva e dentro das "bolsas de piorréia", quando presentes, encontrando 19,6% de casos positivos para *T. tenax*; grupo b) constituído de 250 pacientes de cujas amostras, eram inoculadas apenas saliva, em meios artificiais detectando 28% de positividade para este flagelado.

Wantland & col. (22) em trabalhos realizados sobre a citologia e a morfogênese da *E. gingivalis*, afirmam haver encontrado formas de cistos imaturos (2-4 núcleos) e cistos maduros (8 núcleos).

Keller & col. (12) em pesquisas realizadas sob a microscopia eletrônica, e, estabelecendo comparação entre a *E. gingivalis*, isolada da gengiva de um paciente, e *Amoeba proteus*, protozoário de vida livre, demonstraram que ambas as espécies de amebídeos representam bons materiais para estudo do mecanismo de excreção de substâncias insolúveis e resíduos de alimentos indigestos destas células.

Blake (8), em 146 casos examinados ao microscópio de contraste de fase, encontrou 60% para *E. gingivalis* e 12 para *T. tenax*. Esse pesquisador revela ser freqüente a ocorrência da *T. tenax* na infecção de Vincent e acha que uma das condições para o crescimento do referido flagelado seria concernente à presença de outros microrganismos, incluindo as *Spirochaetes*, devido as mesmas crescerem num sistema biológico em condições ótimas ou aproximada do ótimo, sendo, entretanto, este crescimento, regulado por competição de nutrientes disponíveis. Se, no entanto, tal sistema tornar-se ineficaz para sua estabilidade, resultará numa eventual predominância do organismo mais resistente.

Wantland & Lauer (23) examinando 1.036 amostras, classificadas de acordo com o sexo e idade, associadas ao índice de higiene oral, de pacientes do grupo etário de 31-40

anos portadores de cálculo, língua pilosa e estágios avançados de periodontose, evidenciaram uma positividade de 55,6% para *E. gingivalis* e 20,1% para *T. tenax*.

Gottlieb & Miller (10), em pesquisas realizadas sobre a presença de *E. gingivalis*, na doença periodontal, tentaram determinar a localização deste amebídeo na lesão periodontal. Acreditam ser possível que a periodontite possa estimular o crescimento de *E. gingivalis*. Pesquisaram em pacientes com gengivite ulcerativa necrosante aguda (guna) e em pacientes isentos desta enfermidade, onde encontraram 61% e 7%, respectivamente, para *E. gingivalis*. A seguir, através de cortes histológicos e corados pelo *Gomori* modificado por Wheatley, esse material era retirado ao nível do depósito da placa e bolsa periodontal dos elementos dentários que requeriam exodontias. Em secções histológicas, a freqüência da *E. gingivalis*, em periodontite moderada, foi de 17% e em periodontite avançada de 90%. *E. gingivalis* não foi encontrada dentro do epitélio gengival, porém, sobre a superfície do epitélio sulcular e dentro da placa bacteriana adjacente ao tecido epitelial conectivo do sulco gengival.

Neste trabalho, procurou-se investigar a presença de protozoários parasitas na cavidade oral de crianças, com denticção mista; enfatizou-se a pesquisa da incidência de *E. gingivalis* e *T. tenax*, considerando: idade, sexo, estado bucal e pH salivar.

## Material e Métodos

O material bucal foi coletado em estabelecimentos escolares oficiais, em diversos bairros da cidade do Recife, envolvendo 400 crianças de ambos os sexos, na faixa de 7-14 anos escolhidas aleatoriamente. Foram usados os parâmetros arbitrários de 95% de probabilidade e  $\pm 5\%$  de fidedignidade, para estabelecer o tamanho da amostra (3) distribuídas em: crianças portadoras de cáries dentárias, crianças com alterações gengivais e sem cárie dentária e crianças portadoras de boca clinicamente sã, isto é, mucosa oral e dentes saudáveis, que serviu como grupo controle.

Durante a infância e a puberdade, o periodonto está em constante estado de mudança devido a esfoliação dos dentes, tornando-se difícil a descrição do periodonto normal, que varia com a idade do paciente (4). Como a amostra foi representada por criança na faixa etária de 7 a 14 anos, preferiu-se seguir a orientação (24), que apresenta uma descrição geral do periodonto juvenil, enumerando as seguintes características de normalidade: 1 — gengiva mais rosada, devido a um epitélio mais delgado e menos carnificado, tendo mais vascularização, 2 — ausência de pontilhado, devido a que as papilas conjuntivas da lámina própria são mais curtas e planas; 3 — mais flácidas em razão da menor densidade do tecido conjuntivo da lámina própria; 4 — margens arredondadas originadas pela hiperemia e o edema que acompanha a erupção; 5 — maior profundidade do sulco, facilidade relativa de retração gengival.

Crianças fora das características de normalidade, foram consideradas portadoras de alterações gengivais, não sendo necessário determinar a intensidade das alterações.

O pH bucal de todos os indivíduos foi detectado antes de coletar o material, usando o indicador universal Merck, colocando-se a fita no dorso da língua da criança, durante 1 minuto, retirada com pinça e comparada com a escala padronizada.

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

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

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

Nas crianças portadoras de cárie dentária, a coleta foi realizada com cureta de dentina (Tenax n.º 5), recolhendo-se o material existente na camada mais profunda da cavida-

de. Em seguida, o material foi colocado em tubos de hemólise contendo 2ml de solução de Ringer, a 37°C, conservando-se nesta, durante e após a colheita. O tempo entre a colheita do material, o exame direto a fresco e cultura, não poderia passar de três horas, para evitar a degeneração dos trofozoitos. O material foi centrifugado a 500rpm, durante três minutos e o sedimento retirado com pipeta de Pasteur, colocado entre lâmina e lamínula para exame direto ao microscópio; o restante, foi transferido para meios artificiais, específicos (9, 17). Para amebídeos, foi usado meio difásico de Boeck & Drbohlav, modificada segundo técnica do N.I.H., de acordo com Sawith. Para flagelados, foi adotado o meio de Kupferberg "Trichomonas both", nº 0911-81 da Difco.

## Resultados e Discussão

*T. tenax* não foi encontrada nos exames.

A exame direto ou em cultura *E. gingivalis* apresenta-se como célula grande, 10-35 µm, com endoplasma granuloso, núcleo e vacúolos. Este endoplasma é distinto do ectoplasma que é claro, hialino e muito refringente, formando largos pseudópodos, às vezes lobulados e largos ou curtos e rombos.

O núcleo é dificilmente visto no exame direto a fresco, sendo relativamente pequenos e pobres em cromatina (6).

Dados sobre a estrutura celular de *E. gingivalis* são encontrados nos trabalhos na literatura (12, 22).

Para a maioria dos autores este amebídeo não apresenta forma cística (9, 17, 19) apesar de Wantland & col. (22) usando métodos citoquímicos, terem encontrado cistos imaturos, com 2-4 núcleos e cistos maduros com 8 núcleos. Em nossas observações, não foram encontradas estruturas que pudessem ser consideradas como formas císticas.

No interior dos vacúolos são encontradas bactérias, restos de células epiteliais e fragmentos de leucócitos polimorfonucleares. Vários autores afirmam haver encontrado eritrócitos no interior do citoplasma de *E. gingivalis* (10, 12), no entanto, Rousset & Lavergeat (18) dizem que a ameba não é hematófago e que fagocita partículas grossas.

É espécie anaeróbia, adaptando-se a meios em que a tensão do oxigênio é muito baixa (microaerófilas) e a multiplicação se faz por divisão binária do trofozoita.

Os resultados dos exames estão representados através de Tabelas 1 a 6. Torna-se difícil comparar os dados com os resultados encontrados na literatura brasileira, ou não, pela natureza do estudo ora apresentado.

Das 400 amostras colhidas, foram isoladas 12 cepas de *E. gingivalis*, consequentemente, com 3% de positividade para este amebídeo.

Tabela 1 — Distribuição das amostras por idade e sexo das crianças da cidade do Recife-PE (Brasil)

Idade	Masc.	Sexo	Absolutos	Total	Percentagem
7 anos	20	20	40	100,00	
8 anos	26	26	52	13,00	
9 anos	26	26	52	13,00	
10 anos	26	26	52	13,00	
11 anos	28	28	56	14,00	
12 anos	24	24	48	12,00	
13 anos	26	26	52	13,00	
14 anos	24	24	48	12,00	
Total	200	200	400	100,00	

Crianças com 7 anos de idade, revelam 3 casos positivos (7,5%); com 8 anos de idade, 1 caso positivo (1,92%); crianças de 9-10 anos não apresentaram positividade; crianças com 11 anos de idade, 2 casos positivos (3,57%); com 12 anos de idade, 3 casos positivos (6,25%); com 13 anos de idade, 1 caso positivo (1,92%) e, finalmente, nas crianças com 14 anos de idade, 2 casos positivos (4,16%) (Tabela 2).

**Tabela 2 — Prevalência de *Entamoeba gingivalis*, segundo a idade, sexo e estado bucal das crianças da cidade do Recife-PE (Brasil)**

Idade	Nº de pacientes		Boca clinicamente sã		alterações gengivais		cáries dentárias		Total	Percentagem
	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.	Masc.	Fem.		
7 anos	20	20	—	—	1	—	2	—	3	7,50
8 anos	26	26	—	—	—	—	1	—	1	1,92
9 anos	26	26	—	—	—	—	—	—	—	0,00
10 anos	26	26	—	—	—	—	—	—	—	0,00
11 anos	28	28	—	—	1	1	—	—	2	3,57
12 anos	24	24	—	—	—	1	1	1	3	6,25
13 anos	26	26	—	—	—	—	1	—	1	1,92
14 anos	24	24	—	—	—	1	1	—	2	4,16
Total	200	200	—	—	2	3	6	1	12	3,00

Em relação ao estado bucal das crianças examinadas foram encontrados 7 casos positivos (5,3%), nas crianças portadoras de cáries dentárias, 5 casos positivos (3,6%) nas portadoras de alterações gengivais e negativo, naquelas de boca clinicamente sã (Tabela 3). Em relação ao pH bucal, das 400 amostras examinadas 157 (39,25%) tinham pH bucal 7,0 (neutro). No restante, o pH bucal era ácido: 100 tinham pH bucal 6,0 (25%) e 90 pH bucal 6,6 (22,5%). Não foi notado qualquer caso de crianças com pH bucal alcalino (Tabela 5).

Quanto a prevalência de *E. gingivalis*, segundo o pH bucal, verificou-se que a maior percentagem encontrada foi 5% (5 casos), em crianças portadoras de pH bucal ácido (6,0). Em seguida, 4 casos (2,54%) em portadoras de pH bucal 7,0 (neutro), 2,22% (2 casos) e 2,37% (1 caso) em crianças portadoras de pH bucal 6,6 e 6,8, respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 3 — Resultado global da prevalência de *Entamoeba gingivalis* em relação ao estado bucal das crianças na faixa etária de 7-14 anos, da cidade do Recife-PE (Brasil)**

Local	Nº de exames		Total	Casos positivos para <i>Entamoeba gingivalis</i>	
	Masc.	Fem.		Absolutos	Percentagem
Boca clinicamente sã	66	67	133	0	0,00
Boca com alterações gengivais	66	70	136	5	3,60
Boca com cáries dentárias	68	63	131	7	5,30
Total	200	200	400	12	3,00

**Tabela 4** — Prevalência de *Entamoeba gingivalis* e *Trichomonas tenax*, das 400 amostras estudadas

Protozoários	Total encontrado	Percentagem
<i>Entamoeba gingivalis</i>	12	3,00
<i>Trichomonas tenax</i>	0	0,00

**Tabela 5** — Relação do pH bucal das crianças examinadas do grupo etário de 7-14 anos, por idade e sexo, Recife-PE (Brasil)

pH bucal	Idade	7 anos	8 anos	9 anos	10 anos	11 anos	12 anos	13 anos	14 anos	Total	Percentagem
	Sexo	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
6.0		3	6	5	6	7	6	6	7	10	8
—		—	—	—	—	—	—	1	1	1	—
6.5		—	—	—	—	2	—	—	—	—	10
6.6		5	3	10	10	9	8	10	7	6	1
6.7		—	—	—	—	—	—	—	—	3	2,50
6.8		—	—	—	—	—	—	—	—	3	0,25
—		2	2	—	—	1	—	—	—	—	1
7.0		10	8	9	10	8	11	10	11	4	8
		28	25	27	26	25	27	25	26	13	17
Totais		20	19	24	26	25	27	25	26	12	12
		157	157	157	157	157	157	157	157	157	157
		400	400	400	400	400	400	400	400	400	400
											100,00

**Tabela 6** — Prevalência de *Entamoeba gingivalis*, segundo o pH bucal das crianças, na faixa etária de 7-14 anos. Recife-PE (Brasil)

pH bucal	Nº de casos	Casos positivos para <i>Entamoeba gingivalis</i>	
		Absolutos	Percentagem
6.0	100	5	5,00
—	—	—	—
6.5	10	—	—
6.6	90	2	2,22
6.7	01	—	—
6.8	42	1	2,37
—	—	—	—
7.0	157	4	2,45
Total	400	12	3,00

Em S. Paulo, foi detectado em material de cáries dentárias bolsa periodontal e prótese através de estudos em culturas e exame direto a fresco, 56,3% para *E. gingivalis*, 3,7% para *T. tenax* e 2% para a presença simultânea de ambos (21), em 300 mulheres examinadas.

Na cidade de Ribeirão Preto, S.P. (5), *E. gingivalis* foi encontrada num percentual de 28% e 10% para a associação deste com *Trichomonas tenax*, em 200 mulheres examinadas.

Em nossa pesquisa observou-se apenas 3% de positividade para *E. gingivalis* e ausência de *T. tenax*, no entanto, justifica-se tal achado, por tratar-se de material colhido em crianças, que geralmente apresentam estado de saúde oral melhor que os adultos, daí menor freqüência para *E. gingivalis* e negativo para *T. tenax* comparada aos resultados encontrados acima (5, 21).

## Referências Bibliográficas

1. Accame, J.B. — *Endamoeba gingivalis* en el portador de aparato ortodôntico. *Ortod. Clin.*, 1:127-132, 1950.
2. Amaral, A.D.F. — Sobre a incidência da *E. gingivalis*. *Rev. Paul. Med.*, 35:217-218, 1949.
3. Askin & Colton — Tables in statisticans. New York, Bayne & Noble, 1960.
4. Baer, P.N. & Sheldon, D.B. — Enfermedad periodontal en niños y adolescentes. Buenos Aires, Editorial Mundi, 1975.
5. Barreto, M.P. & Zago Filho, H. — Prevalência de *Trichomonas tenax* (O.F. Muller, 1773) e da *Entamoeba gingivalis* (Gros, 1849) em pacientes de ambulatório da Santa Casa de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop.*, 9:327-332, 1957.
6. Barrett, M.T. — The protozoa of the mouth in relation to pyorrhea alveolaris. *The Dent. Cosmos*, 56:948-953, 1914.
7. Beatman, L.H. — Studies on *Trichomonas buccalis*. *J. Dent. Res.*, 13:339-349, 1933.
8. Blake, G.C. — The microbiology of acute ulcerative gingivitis with reference to the culture of oral *Trichomonads* and *Spirochaetes*. *Proc. R. Soc. Med.*, 61:131-137, 1968.
9. Craig, C.F. — Laboratory diagnosis of protozoan diseases. Philadelphia, Lea & Febiger, 1942.
10. Gottlieb, D.S. & Miller, L.H. — *Entamoeba gingivalis* in periodontal disease. *J. Periodont.*, 42:412-415, 1971.
11. Hinshaw, H.C. — Experimental infection of dogs with *Endamoeba gingivalis* and *Trichomonas buccalis* of human mouth. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 25:430, 1928.
12. Keller, D.; Orland, F.J. & Baird, G. — Ultrastructure of *Entamoeba gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 46:1010-1018, 1967.
13. Lapierre, J. & Rousset, J.J. — L'infestation à protozoaires buccaux. Annales de parasitologie humaine et comparée. Paris, 48:205-216, 1973.
14. Lauvergeat, J.A. — Fréquence des protozoaires buccaux dans une population définie. (Jeunes français accomplissant leur service militaire). Paris, Faculté de Médecine Saint-Antoine, Université de Paris, VI, 1970. (These pour le Doctorat en Medicine).
15. Mayrink, W. — Protozoários de interesse odontológico. *Arg. Cent. Est. Fac. Odont. da U.M.G.*, 2:129-134, 1965.
16. Miligi, G.; Magudda-Borzi, L. & Mento, G. — La frequenza dei portatori di "Trichomonas tenax", e di "Entamoeba gingivalis" in alcune zone della provincia di Messina. *Arch. Ital. Sci. Med. Trop. e Parassitol.*, 45:95-99, 1964.
17. Pessoa, S.B. — Parasitologia médica. 7. ed. Rio de Janeiro, Koogan, 1969.
18. Rousset, J.J. & Lauvergeat, J.A. — Protozoaires buccaux; enquête épidémiologique. *La Presse Médicale*, 79:1495-1497, 1971.
19. Verri, R.A. & Salata, I. — Estudos sobre protózios da boca humana, I — *Endamoeba gingivalis* (Gros, 1894). *Rev. Ass. Paul. Cirurg. dent.*, 15:252-260, 1961.
20. Verri, R.A. & Salata, I. — Estudos sobre protózios parasitas da boca humana. II — *Trichomonas tenax* (O.F. Muller, 1773) Dobell, 1939. *Sel. Odontol.*, 20:17-21, 1964.
21. Verri, R.A.; Banhos, R. & Salata I.C.D. — Estudos sobre protózios parasitas da boca humana. III — Incidência da *Endamoeba gingivalis* (Gros, 1849) e *Trichomonas tenax* (O.F. Muller, 1773) Dobell, 1939, em uma amostra da população de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo. *R.G.O.*, 9:28-35, 1966.
22. Wantland, W.W.; Wantland, E.M. & Remo, J.M. — Cytology and morphogenesis of *Entamoeba gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 40:624, 1961.
23. Wantland, W.W. & Lauer, D. — Correlation of some oral hygiene variables with age, sex, and incidence of oral protozoa. *J. Dent. Des.*, 49:293-297, 1970.
24. Zappler, S.E. — Periodontal disease in children. *J.A.D.A.*, 3:333, 1948.

## Biotin and folic acid determination in yogurt prepared from different starter cultures

Célia Lúcia de Luces Fortes Ferreira

Dept.<sup>o</sup> de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa  
36570 Viçosa, MG, Brasil

& Robert Bradley Jr.

University of Wisconsin, Madison 53705 WI, USA

### Summary

Biotin and folic acid concentrations were microbiologically assayed in yogurt prepared from starter cultures containing different microorganisms. Starter culture A (AY-3) contained *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* in a 25:50:25, proportion respectively. Starter culture B (LBST-4) contained *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in a 50:50 proportion. The assay microorganism for biotin was *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 and for folic acid, *Streptococcus faecalis* ATCC 8043. It was observed a decrease in the biotin content in the final product manufactured with both cultures,  $1.490 \pm 0.22\mu\text{g}/100\text{g}$  and  $1.390 \pm 0.43\mu\text{g}/100\text{g}$  in yogurt from cultures A and B respectively against  $4.087\mu\text{g}/100\text{g}$  in milk prior to incubation, indicating its utilization by the growing microorganisms. However, folic acid concentrations  $3.252 \pm 0.5\mu\text{g}/100\text{g}$  and  $3.321 \pm 0.5\mu\text{g}/100\text{g}$  in yogurt A and B respectively corresponded to almost a ten fold increase when compared to the  $0.371\mu\text{g}/100\text{g}$  in the milk prior to incubation, showing that yogurt microorganisms produce such vitamin. From this work it was concluded that the *Lactobacillus acidophilus* added to yogurt culture A did not alter significantly the concentration of biotin and folic acid in the final product.

### Resumo

*Determinação de biotina e ácido fólico em iogurte preparado com diferentes culturas starters*

Concentrações de biotina e ácido fólico foram determinadas microbiologicamente em iogurte preparado com tipos diferentes de culturas starters. A cultura starter A (AY-3) continha *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* na proporção 25:50:25, respectivamente. Cultura starter B (LBST-4) continha *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* na proporção 50:50. Para determinação da biotina utilizou-se o *Lactobacillus plantarum*, ATCC 8014 e para determinação do ácido fólico utilizou-se o *Streptococcus faecalis*, ATCC 8043. Foi observada uma queda nos teores de biotina no produto final produzido por ambas as culturas  $1.490 \pm 0.22\mu\text{g}/100\text{g}$  e  $1.390 \pm 0.43\mu\text{g}/100\text{g}$  (culturas A e B respectivamente), indicando a sua utilização pelas culturas lácticas envolvidas. No entanto, os teores de ácido fólico  $3.252 \pm 0.5\mu\text{g}/100\text{g}$  e  $3.321 \pm 0.5\mu\text{g}/100\text{g}$  em iogurte produzido pelas culturas A e B respectivamente corresponderam a quase dez vezes o encontrado no leite utilizado na mistura base ( $0.371\mu\text{g}/100\text{g}$ ), indicando a produção desta vitamina durante a multiplicação dos microrganismos envolvidos.

Desta experimentação, concluiu-se que a inclusão do *Lactobacillus acidophilus* na cultura starter A, destinada à fabricação do iogurte não alterou os teores da biotina e ácido fólico, uma vez que as concentrações encontradas não foram significativamente diferentes.

## Introduction

Within the last few years there has been a considerable interest in yogurt, and a change of attitude toward the product can be recognized throughout the world. Previously, the sales of this product were due almost entirely to recommendation from the medical profession, based on its reputed therapeutic value (3, 5). At the present time, Metchnikoff's well known theory (11) that longevity of Bulgarians was due to the regular consumption of yogurt prepared with *Lactobacillus bulgaricus*, which he called the bacillus of "long life", is no longer accepted as it was in the past. Possibly, the most severe criticism which has been made is that the *Lactobacillus bulgaricus* can not establish itself in the intestinal tract (14) as can the *Lactobacillus acidophilus* (4, 8, 11, 16). Nevertheless, considerable use of yogurt is still made by the medical profession in minor intestinal disorders, mainly those resulted from oral antibiotic treatment.

Yogurt is a fermented product resulted from the inoculation of cultures containing *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* into milk. However some manufacturers include a small proportion of *Lactobacillus acidophilus* in their products (3). With the increasing emphasis on nutritional quality of foods, a greater knowledge of bacteriologically induced changes in nutrient is important. It has been reported that there is insufficient information published regarding the nutritional value of cultured dairy foods, especially those other than cheese (6, 7, 9, 10, 12, 15). Therefore, the limitation on data upon vitamin B content in yogurt, and the possibility that the microorganisms involved in the fermentation process alter the amount of vitamins, such as biotin and folic acid, in the final product, lead to this research work.

## Material and Methods

**Yogurt manufacture** — Grade "A" milk from the University of Wisconsin Dairy Plant was used throughout this experiment. The manufacturing process involved a standardization of milk containing 3.5% milk fat and condensed skimmilk with 33% solids not fat (SNF) to yield a 4kg mix containing 2% milk fat and 14% SNF. This mix was pasteurized at 85°C for 30 minutes cooled to 70°C and homogenized in a Manton-Gaulin homogenizer at 141 kg/cm<sup>2</sup> on the first stage and 35kg/cm<sup>2</sup> on the second. Then the milk was cooled to 42°C and divided into two batches each being inoculated with one of the two starter cultures involved in this investigation. Incubation was followed at 42°C until the titratable acidity (TA) reached 0.85—90% expressed as lactic acid. The neutralization was carried out with 0.1N NaOH and phenolphthalein (alcoholic solution) as end point indicator. After the expected TA was reached the yogurt was transferred to a refrigerator at 5°C. After storage following incubation samples were taken for vitamin assays.

**Starter cultures** — Frozen concentrate cultures were acquired from Christian Hansen's Inc., Milwaukee, WI, USA (yogurt culture AY-3, refer as starter A) and Miles Laboratories, Marschall Division, Madison, WI, USA (yogurt culture LBST-4, refer as starter B). Starter A contained *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus* and *Streptococcus thermophilus* in a 25:50:25 ratio. Starter B contained *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in a 50:50 ratio. After heating and homogenizing, the yogurt mixes were inoculated with a 3.5% inoculum of the cultures and incubated at 42°C using short set incubation.

**Determination of vitamin content** — The vitamin content was determined after an arbitrary period of 9 to 24 hour after completion of the incubation of the two batches of yogurt. Biotin and folic acid were microbiologically assayed following the methods described in the Methods of vitamin assay, Association of Vitamin Chemists (1) with slight modifications made by Shahani & col. (17) to fit the conditions dictated by the nature of the product. Vitamins extracts were prepared separately for each analysis and assayed with *Streptococcus faecalis*, ATCC 8043 (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA) for folic acid and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, for biotin. The summary of the overall procedure follows each assay description.

**Procedure** — Pure lyophilized cultures acquired from the ATCC were kept refrigerated until the time for activation in PTA broth (Proteose Triptone Agar, broth, Difco). Incubation followed at 37°C for 16-24 hours and a loopful of this active culture was stabbed into a tube containing stock substrate. Details of this procedure are thoroughly covered in the Methods of vitamin assay, chapter 3 (1). Active stab cultures (1-14 days old) kept under refrigeration were available for preparation of the inoculum. Inocula were started 16 to 24 hours before used for assay. The time for inoculation of the assay tubes was chosen in such a way that titration was carried out 72 hours later.

**Preparation of assay tubes** — To duplicate were added aliquots of the test solution. Several levels of the test solution were used so that several tests would fall on the standard curve (prepared as indicated in the Methods of vitamin assay, chapter 3 (1). For biotin, the aliquots chosen were 0.5ml; 1.0ml; 1.5ml and 2.0ml. For folic acid the aliquots were 1, 2, 3 and 4ml. To each tube sufficient water was added to bring the volume to 5ml. To each of these tubes, 5.0ml of basal medium stock solution was added.

**Sterilization, inoculation, incubation** — The samples prepared as mentioned were autoclaved for 15 minutes at 15 lb pressure. Tubes were then cooled to 37°C in a water and inoculated with one drop of the inoculum (prepared as indicated in the Methods of vitamin assay, chapter 3 (1). Incubation followed at 37°C for 72 hours. Afterwards all the tubes were refrigerated.

**Titration** — The contents of each tube were transferred to a 125ml Erlenmeyer flask. Each tube were rinsed with 10ml distilled water and this rinsing was added to the flask. Followed the addition of 0.2ml of 0.1% Bromothymol blue solution and titration with 0.1N NaOH. All tubes were titrated to the same endpoint, a green color, about pH 6.8. A flask was held as reference color for each ten titrations and then substituted for a new flask, as the color in the reference flask change on standing. Care was taken for the whole series of tubes be titrated with the same lot NaOH.

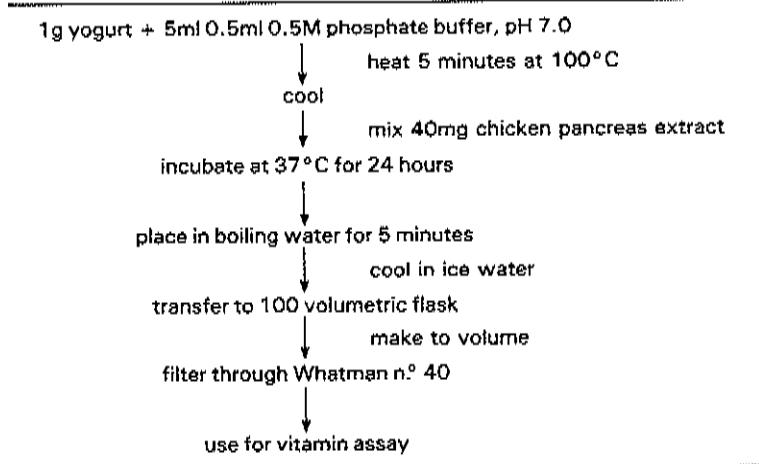
**Calculation** — A standard curve was drawn by plotting mls 0.1N NaOH against concentration of vitamin per tube in the standard series. The vitamin content of the unknown series was determined by interpolation of the titer values on the standard curve, Figures 3 and 4. Vitamin content was calculated from the average of the values for 1ml of the test solution obtained from not less than three sets of these tubes, using the following formula:

$$\mu\text{g per g} = \frac{\text{average } \mu\text{g per ml} \times \text{volume}}{\text{wt. of sample}} \times \text{dilution factor}$$

**Folic acid assay** — One gram of yogurt was mixed in a 100ml Erlenmeyer with 5ml of 0.5M phosphate buffer at pH 7.0, and heated 5 minutes at 100°C. Cooling followed and 40mg of chicken pancreas extract added. Incubation followed at 37°C for 24 hours. The sample was placed in boiling water for 5 minutes, cooled in ice water, transferred to a 100ml volu-

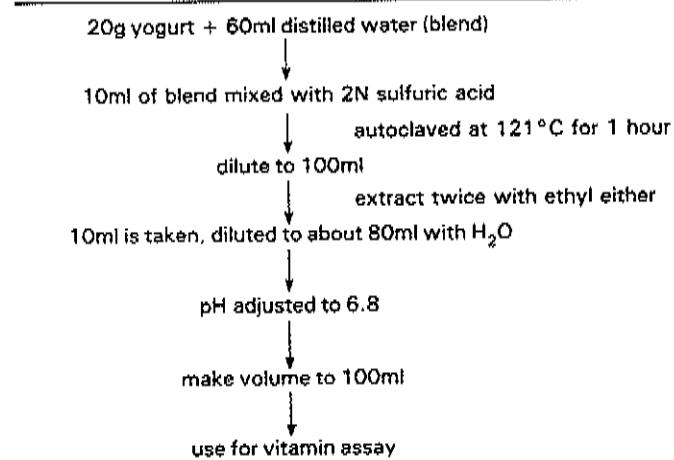
metric flask and diluted to volume. The solution was filtered through Whatman n° 40 and used for the vitamin assay as described in the Methods of vitamin assay (1). The overall procedure is summarized in Figure 1.

**Figure 1 — Overall procedure for folic acid sample extraction**



**Biotin assay** — Twenty grams of yogurt were blended with 60ml of distilled water and 10ml of this blend were mixed with 25ml 2.0N sulfuric acid and autoclaved at 121°C for 1 hour (pressure = 1.033kg/mg<sup>2</sup> gauge). The autoclaved sample was diluted to 100ml and extracted twice with ethyl ether. Following extraction a 10ml aliquot was diluted to about 80ml with distilled water in a 100ml volumetric flask, the pH was adjusted to 6.8 made to volume with distilled water and used for determination of biotin. The overall procedure is shown in Figure 2.

**Figure 2 — Overall procedure for biotin sample extraction**



## Results and Discussion

Vitamin determination reported throughout this investigation represent means of triplicate analysis performed on three trials.

**Folic acid** — The standard curve for folic acid is shown in Figure 3 and the data from this experiment are shown in Table 1.

Figure 3 — Folic acid standard curve

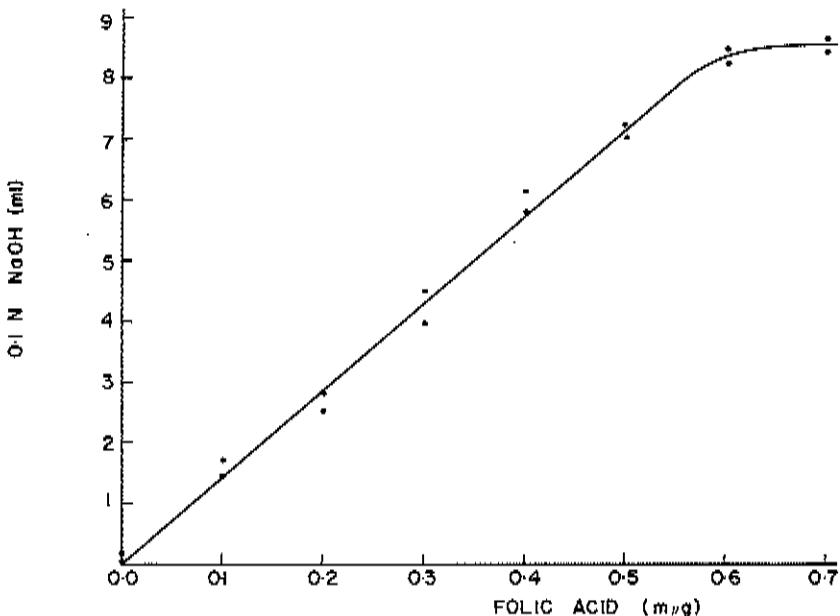


Table 1 — Folic acid concentration in yogurt

Trials	Yogurt A <sup>a</sup> μg/100g	Yogurt B <sup>b</sup> μg/100g
1	2.507	3.018
2	3.473	4.077
3	3.775	2.869
Mean	3.252 ± 0.5	3.321 ± 0.5

a. Yogurt produced from starter containing *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*. b. Yogurt produced from starter containing *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*.

The present investigation showed an average of  $3.252 \pm 0.5\text{ }\mu\text{g}$  of folic acid/100g in yogurt A and  $3.321 \pm 0.5\text{ }\mu\text{g}$  of folic acid/100g in yogurt B. This corresponds to almost a tenfold increase when compared with  $0.371\text{ }\mu\text{g}$  of folic acid/100g in the milk prior to incubation. However this result is likely to decrease during storage as claimed by Christensen (2). He explained the increase of folic acid levels during fermentation followed by a decrease as a result of high acidity and consequent suppression of growth of *Strep-*

*tococcus thermophilus* by *Lactobacillus bulgaricus*. Therefore, the folic acid increase in the early stages of fermentation is a consequence of the high increase in numbers of the cocci. Since yogurt production involves a symbiotic growth of the cocci and the rods in the early stages and a lethal action of the rods upon the cocci later in the incubation, the concentration of folic acid is likely to decrease with time. Hence, we can also suggest that the earlier the yogurt is consumed after fermentation, the higher the folic acid concentration will be. Although slightly higher concentration of folic acid was found in yogurt B, this difference was not significant at the 5% level. An explanation for this slightly higher folic concentration in yogurt B could be attributed to the reaction of the medium at time of sampling: yogurt A had a lower pH (average = 4.43) than yogurt B (average = 4.57) at the time of sampling, the high acid production favors the rods leading to a decrease in numbers of the cocci with a subsequent lack of folic acid production by these microorganisms.

**Biotin** — The standard curve for biotin is shown in Figure 4 and the data from this experiment are in Table 2.

Figure 4 — Biotin standard curve

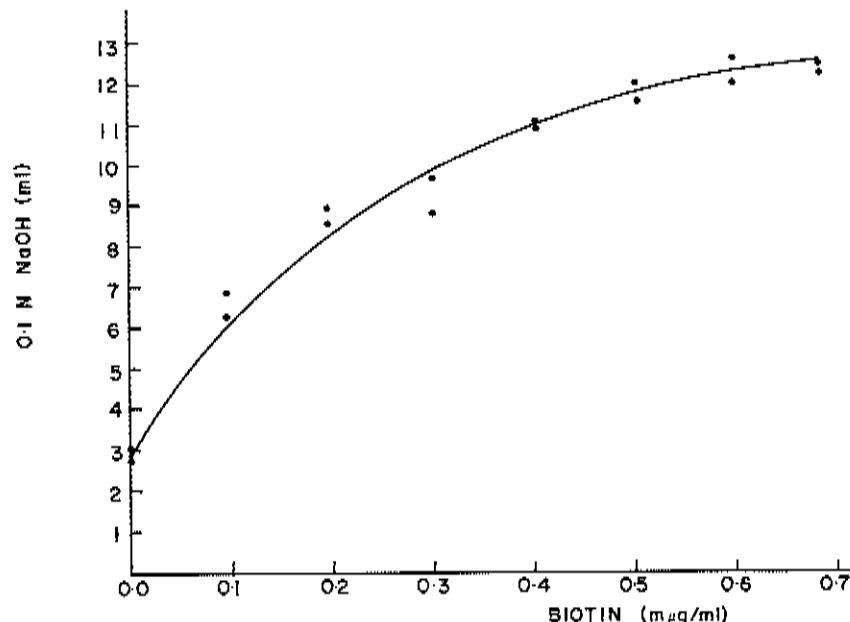


Table 2 — Biotin concentration in yogurt

Trials	Yogurt A <sup>a</sup> μg/100g	Yogurt B <sup>b</sup> μg/100g
1	1.260	1.071
2	1.424	1.110
3	1.780	2.000
Mean	1.490 ± 0.22	1.390 ± 0.45

a. Yogurt prepared from starter containing *S. thermophilus*, *L. acidophilus* and *L. bulgaricus*. b. Yogurt prepared from starter containing *S. thermophilus* and *L. bulgaricus*.

This research showed  $1.40 \pm 0.22\mu\text{g}$  biotin/100g of yogurt A and  $1.39 \pm 0.43\mu\text{g}/100\text{g}$  of yogurt B. This corresponds to almost a three fold decrease when compared to the concentration of biotin in the milk prior to incubation ( $4.087\mu\text{g}$  biotin/100g milk).

The importance of biotin as a growth factor for lactic acid bacteria has been well established in the literature (7, 13, 14). Data from this experiment corroborated that the microorganisms involved in the fermentation of yogurt consume the biotin available in the medium during the fermentation process. However to have a better view of the extent of this consumption more time should elapse between the production of the yogurt and the sampling for the biotin assay. Although biotin levels in yogurt A were slightly higher than those in yogurt B, these values were not significant at the 5% level.

## Conclusion

The data from this investigation showed that the different starter cultures used to prepare yogurt did not alter significantly the biotin and folic acid concentration in the final product. However, determinations of those vitamins after different storage periods would permit closer informations on yogurt contribution of such vitamins to the consumer.

## References

1. Association of Vitamin Chemists — Methods of vitamin assay. New York, Interscience Publishers, 1951.
2. Christensen, V.M. — Yogurt: the bright star among dairy products. *Food Prod. Dev.*, 4:18, 1970.
3. Crawford, J.M. — How to succeed with yogurt. *Dairy Eng.*, 1:4-10, 1962.
4. Davis, J.G. — Yogurt II. *Food*, 21:284, 1952.
5. Davis, J.G. — Yogurt and other cultured milks. *J. Soc. Dairy Technol.*, 9:160-165, 1956.
6. Gregory, M.E. — Vitamin in milk and dairy products. *J. Dairy Res.*, 34:169, 1967.
7. Kay, N.M.; Vakil, J.R. & Shahani, K.M. — B vitamin content of cheddar cheese. *J. Nutr.*, 86:362, 1965.
8. Kopeloff, N. — *Lactobacillus acidophilus*. Baltimore, The Williams & Wilkins, 1926.
9. Lawrence, J.M.; Herrington, B.L.; Maynard, L.A. — The nicotinic acid, biotin and pantothenic acid content of cow's milk. *J. Nutr.*, 32:76, 1946.
10. McGillivray, W.A. — Nutritive value of milk for man. *J. Dairy Res.*, 29:211, 1962.
11. Metchnikoff, E. — The prolongation of life: optimistic studies. New York, Putnam's Sons, 1908.
12. National Dairy Council — Cultured dairy foods. *Dairy Council Digest*, 43:4, 1972.
13. Pray, E.E. — Growth factors of *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.*, 42:291, 1941.
14. Rasic, J.L. & Kurmann, J.A. — Fermented fresh milk products: yogurt. Denmark Technical Dairy Publishing House, Vanlose, 1978.
15. Reddy, K.P.; Shahani, K.M. & Kulkavini, S.M. — B-complex vitamins in cultured and acidified yogurt. *J. Dairy Sci.*, 59:191, 1976.
16. Rettger, L.F.; Levy, M.N.; Weinstein, L. & Weiss, J.L. — *Lactobacillus acidophilus* and its therapeutic application. New Haven, Yale University Press, 1922.
17. Shahani, K.M.; Hathaway, I.L. & Kelly, P.L. — B-complex vitamin content of cheese. II — Niacin, pantothenic acid, pyridoxine, biotin and folic acid. *J. Dairy Sci.*, 45:833, 1962.

# Crescimento de micobactérias isoladas de solo e de esgoto, em presença de petróleo, diesel e hidrocarbonetos\*

Angela Maria Werneck Barreto  
& Paulo Pinto Gontijo Filho

*Instituto de Microbiologia UFRJ, Centro de Ciências da Saúde, Bloco I, Ilha do Fundão  
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

## Resumo

A partir de amostras de solo poluído com resíduos domésticos e petróleo, de solo de jardim e de esgoto, foram isoladas 130 estirpes de micobactéria, através do tratamento prévio com solução de hidróxido de sódio a 4% e de verde malaquita a 0,2%. Cerca de 70% dos microrganismos isolados foram identificados como potencialmente patogênicos e representados na sua maioria por *M. fortuitum* (62%) e *M. scrofulaceum* (7%). Avaliando-se a capacidade da degradação de petróleo, diesel, heptadecano e hexadecano, apenas as estirpes de *M. fortuitum* apresentaram crescimento nos dois primeiros substratos em 28 dias de incubação. Em relação aos hidrocarbonetos, estes mesmos microrganismos cresceram em 14 dias. As estirpes de *M. diernhoferi*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum* e *M. flavescens* somente cresceram no heptadecano após 28 dias. As micobactérias, isoladas de ambiente poluído com resíduos de óleo, não demonstraram atividade mais intensa na presença destes substratos, demonstrando que esta propriedade não depende da procedência dos microrganismos.

## Summary

### *Growth of mycobacteria from soil and sewage on petrol, diesel and hydrocarbons*

One hundred and thirty strains of mycobacteria were isolated from soil samples polluted with house wastes and petroleum residues, from garden soil and from sewage after treating the materials with 4% sodium hydroxide and 0.2% malachite green. Almost 70% of the isolates were identified as potentially pathogens and were mostly represented by *M. fortuitum* (62%) and *M. scrofulaceum* (7%). *M. fortuitum* was the only species able to degrade petroleum, diesel oil, heptadecan and hexadecan since growth was observed in petroleum and diesel oil after 28 days and in heptadecan and hexadecan after 14 days of incubation. *M. diernhoferi*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum* and *M. flavescens* strains grew after 28 days in heptadecan. The ability to degrade petroleum and/or derivatives was not related to the sources of isolation since it was not observed a greater activity among the strains obtained from places polluted with oil.

## Introdução

Vários autores descreveram a ocorrência de micobactérias no solo (1, 2, 6, 15) e em esgotos (9, 12). Diversas estirpes de micobactérias foram testadas, quanto à utilização de

\* Trabalho realizado com recursos da FINEP (Convênio 527/CT).

hidrocarbonetos, desde o metano até o hexadecano, verificando-se melhor degradação destas substâncias a partir do decano (7, 8). Estirpes do gênero *Mycobacterium*, presentes em água poluída com resíduos de petróleo, degradam hexadecano e heptadecano, sendo que algumas crescem até mesmo em presença de óleo cru (3). Em continuação a estudos anteriores (3), foi avaliada a capacidade de micobactérias, isoladas de solo e de esgoto, que utilizam hidrocarbonetos, diesel e petróleo.

## Material e Métodos

**Amostras** — Foram utilizadas três amostras de lodo seco de esgoto, quatro de esgoto "in natura", duas de solo de jardim e sete de solo poluído com resíduos de óleo. Tomaram-se 5g das amostras sólidas e 5ml das líquidas, tratando-se os materiais com solução de hidróxido de sódio a 4% e verde malaquita a 0,2%, segundo o método de Wolinsky & Rynearson (15). Procedendo-se em seguida a semeadura em tubos com meio de Lowenstein-Jensen, incubados a 37°C, durante quatro semanas. As colônias selecionadas foram caracterizadas quanto à álcool-ácido resistência, pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen e identificadas através de testes bioquímicos (13).

**Técnica** — Foram testadas 19 estirpes de crescimento rápido e 10 de crescimento lento, paralelamente às respectivas amostras-tipo, quanto à utilização de petróleo bruto (cedido pela Refinaria de Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ), diesel II (fração VII, proveniente deste mesmo petróleo), heptadecano e hexadecano ("Prairie Regional Laboratory National Research Council Saskatoon, Saskatchewan, Canada"), como única fonte de carbono. Os substratos foram incorporados a meio mineral (10).

O meio foi distribuído em volumes de 5ml, em tubos (12 x 150mm) com tampas de rosca, seguindo-se a adição de 25 µl de substrato, através de pipeta calibrada. Autoclavou-se a 120°C durante 10 minutos; o pH, antes e após este processo, foi 6,8 e 7,0 respectivamente, sendo ajustado para 7,2 com NaOH N, antes da autoclavagem.

O inóculo foi realizado a partir de suspensão levemente turva, comparável à do tubo nº 1 da escala de McFarland, preparada a partir de crescimento bacteriano na fase logarítmica.

Os tubos foram semeados em duplicata com 0,1ml de suspensão bacteriana e incubados em estufa a 37°C durante 28 dias, sob agitação de 100rpm (Laboratory rotator model G2, New Brunswick Scientific Co., Inc., New Brunswick, NJ).

Foram utilizados os seguintes controles: a) meio mineral (5ml) + inóculo (0,1ml); b) meio mineral com 5% de glicerol (4,5ml) + glicose a 5% (0,5ml) + inóculo (0,1ml); c) meio mineral (5ml) + substrato (25 µl).

As leituras foram realizadas com 14 e 28 dias de incubação, registrando-se o crescimento visível como:

- a) - = ausência de crescimento
- b) (+) = crescimento na parede do tubo
- c) + = formação de película
- d) ++ = formação de película e presença de pequenos grumos
- e) +++ = formação de película e presença de grumos no fundo do tubo.

## Resultados

Foram selecionadas 130 colônias, com base no tempo de crescimento e nas seguintes características: aspecto (liso ou rugoso), dimensão e presença ou ausência de pigmentação. A maioria (55%) das estirpes procedeu do solo de Manguinhos, seguindo-se aqueles de solo de jardim, lodo seco e esgoto.

Houve predominância de colônias lisas, destituídas de pigmentação e menores que 2mm.

A maioria comportou-se como *M. fortuitum*, representando 86% das estirpes de crescimento rápido (Tabela 1).

Para a experiência de degradação de óleo, diesel e hidrocarbonetos, foram selecionadas 27 estirpes, sendo 19 de crescimento rápido e 10 de crescimento lento. A relação destas estirpes está na Tabela 2, juntamente com as respectivas amostras-tipo. A espécie mais representada foi *M. fortuitum*, sendo que duas estirpes desta micobactéria (87 e 88) foram isoladas por Cardoso & Gontijo (3) e demonstraram capacidade de crescer em presença de heptadecano e hexadecano, como única fonte de carbono (4).

Tabela 1 — Distribuição das estirpes isoladas de acordo com as amostras estudadas

Estirpes	Amostras				Isoladas	
	lodo seco	esgoto	solo de jardim	solo de Manguinhos	Total	%
<i>M. fortuitum</i>	23	3	21	34	81	62,30
<i>M. phlei</i>	—	—	—	5	5	3,84
<i>M. thermoresistibile</i>	—	—	—	3	3	2,30
<i>M. diernhoferi</i>	—	—	1	1	2	1,54
<i>M. aurum</i>	—	—	—	1	1	0,77
<i>M. terrae</i>	—	1	6	3	10	7,69
<i>M. triviale</i>	—	1	—	8	9	6,92
<i>M. scrofulaceum</i>	—	—	—	9	9	6,92
<i>M. flavescens</i>	—	—	—	7	7	5,38
Não identificadas	—	2	—	1	3	2,30
Total	23	7	28	72	130	100,0

Tabela 2 — Relação das estirpes selecionadas para o estudo da degradação de petróleo, diesel e hidrocarbonetos

Espécie	amostra-tipo	solo de Manguinhos	solo de jardim	esgoto "in natura"	lodo seco de esgoto	água
<i>M. fortuitum</i>	ATCC-6841	101, 126, 130 148, 150, 185	60, 58, 82	138	30, 36, 38	87,88
<i>M. diernhoferi</i>	ATCC-19340	88	73	—	—	—
<i>M. phlei</i>	ATCC-10142	100, 103	—	—	—	—
<i>M. terrae</i>	ATCC-15755	178	80	135	—	—
<i>M. triviale</i>	ATCC-23292	123, 124	—	134	—	—
<i>M. scrofulaceum</i>	ATCC-19981	151, 154	—	—	—	—
<i>M. flavescens</i>	ATCC-17474	111, 115	—	—	—	—

As estirpes de *M. fortuitum*, com algumas exceções, cresceram em meio sintético, contendo heptadecano e hexadecano. O crescimento foi evidenciado em 14 dias, intensificando-se ao fim de quatro semanas (Tabela 3). Estes microrganismos também cresceram na presença de petróleo e diesel, excetuando-se a estirpe de n.º 150, em relação ao petróleo e a de n.º 58, em relação ao petróleo e diesel. O crescimento, na presença destes substratos, foi melhor evidenciado na leitura de 28 dias. As demais amostras de crescimento rápido, identificadas como *M. diernhoferi* e *M. phlei*, assim como as respectivas amostras-tipo, não utilizaram petróleo e diesel. Em relação ao heptadecano, estas micobactérias forneceram resultados positivos, ao fim de quatro semanas. A amostra-tipo de *M. diernhoferi* (ATCC-19340) e o isolado de n.º 100 (*M. phlei*) evidenciaram crescimento neste hidrocarboneto, em 14 dias. Estas estirpes e a de n.º 103 também utilizaram hexadecano, ao contrário das demais.

A maioria das amostras de crescimento lento não cresceu na presença de petróleo e diesel e aquelas identificadas como *M. terrae* foram incapazes de degradar os hidrocarbonetos (Tabela 4). O hexadecano foi utilizado apenas pelas estirpes de *M. flavescens* e pela

Tabela 3 — Degradação de petróleo, diesel e hidrocarbonetos pelas estirpes de crescimento rápido

Estirpe	controle positivo		petróleo		diesel		heptadecano		hexadecano	
	14d	28d	14d	28d	14d	28d	14d	28d	14d	28d
<i>M. fortuitum</i>										
ATCC-8841	+++	+++	(+)	(+)	-	+	+	++	+	++
30	+++	+++	-	+	-	++	-	++	+	++
36	+++	++*	-	+	-	+	++	++	+	++
38	+++	+++	*	+	+	+	++	++	*	+
58	+++	+++	-	..	-	-	-	+	-	+
60	+++	++*	-	+	+	+	+	+	-	+
82	+++	+++	-	(+)	-	++	-	++	-	++
87	+++	+++	-	(+)	-	+	+	++	+	++
88	+++	+++	*	+	+	+	+	++	+	++
101	+++	++*	-	(+)	-	++	+	++	+	++
126	+++	+++	*	(+)	-	++	+	++	+	++
130	+++	+++	-	(+)	-	(+)	+	++	+	++
138	+++	+++	-	(+)	*	++	+	++	*	++
148	+++	++*	-	(+)	-	++	+	++	+	++
150	++*	++*	*	-	-	(+)	+	++	+	++
185	+++	+++	*	(+)	*	(+)	+	++	*	++
<i>M. diernhoferi</i>										
ATCC-19340	++	++	-	-	-	-	(+)	+	(+)	+
73	+++	+++	*	-	-	-	*	+	-	-
98	+++	+++	-	*	-	-	-	+	-	-
<i>M. phlei</i>										
ATCC-10142	+++	+++	-	-	-	w	-	(+)	-	w
100	+++	++*	-	-	-	-	(+)	++	-	++
103	(+)	++	-	-	-	-	w	(+)	-	(+)

- = ausência de crescimento; (+) = crescimento na parede do tubo; + = formação de película; ++ = formação de película e presença de pequenos grumos; +++ = formação de película e presença de grumos no fundo do tubo.

Tabela 4 — Degradação de petróleo, diesel e hidrocarbonetos pelas estirpes de crescimento lento

Estirpe	controle positivo		petróleo		diesel		heptadecano		hexadecano	
	14d	28d	14d	28d	14d	28d	14d	28d	14d	28d
<i>M. terrae</i>										
ATCC-15755	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	-
80	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
135	-	(+)	*	-	-	-	-	-	-	-
176	-	(+)	-	*	*	-	-	-	-	-
<i>M. triviale</i>										
ATCC-23292	++*	+++	-	+	-	++	+++	+++	++*	++*
123	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)
124	+	+	-	*	*	-	-	-	-	-
134	-	(+)	-	-	-	-	*	-	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>										
ATCC-19981	(+)	(+)	*	-	-	-	-	(+)	-	-
151	-	(+)	-	-	-	-	*	(+)	-	-
164	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	*	*
<i>M. flavescens</i>										
ATCC-14474	++*	+++	-	-	(+)	+	-	++	-	+
111	*	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)
115	-	(+)	-	-	-	-	-	(+)	-	(+)

- = ausência de crescimento; (+) = crescimento na parede do tubo; + = formação de película; ++ = formação de película e presença de pequenos grumos; ++\* = formação de película e presença de grumos no fundo do tubo.

amostra de nº 123 (*M. triviale*), que juntamente com as estirpes de *M. scrofulaceum* demonstraram crescimento após 28 dias no meio mineral contendo heptadecano.

Amostras de solo e esgoto, contêm micobactérias, incluindo estirpes potencialmente patogênicas, tais como *M. fortuitum* (62%) e *M. scrofulaceum* (7%).

## Referências Bibliográficas

- Brown, L.R. & Pabst, G.S. — Petroliferous soil as a source of pathogenic atypical mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis., 96:1076-1077, 1967.

2. Cardoso, C.L.; Barreto, A.M.W. & Gontijo Filho, P.P. — Isolamento de micobactérias termófilas a partir de solo. IX Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1978.
3. Cardoso, C.L. & Gontijo Filho, P.P. — Ocorrência de micobactérias em águas poluídas com resíduos industriais e domésticos. Rev. Microbiol. (São Paulo), 10:59-65, 1979.
4. Cardoso, C.L. & Gontijo Filho, P.P. — Utilização de petróleo e hidrocarbonetos por micobactérias. Rev. Microbiol. (São Paulo), 10:46-49, 1979.
5. Davis, J.B.; Chase, H.H. & Raymond, R.L. — *Mycobacterium paraffinicum* n. sp., a bacterium from soil. Appl. Microbiol., 4:310-315, 1956.
6. Gontijo Filho, P.P. — Isolamento e identificação de micobactérias do solo. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, UFRJ, 1972. (Tese de Doutoramento).
7. Grange, J.M. — A micromethod for the study of n-paraffin utilization by mycobacteria. J. Appl. Bact., 37:465-468, 1974.
8. Lukins, H.B. & Foster, J.W. — Utilization of hydrocarbons and hydrogen by mycobacteria. Z. Allgem. Mikrobiol., 3:251-264, 1963.
9. Matthews, P.R.J.; Collins, P. & Jones, P.W. — Isolation of mycobacteria from dairy creamery effluent sludge. J. Hyg. (Camb), 76:407-413, 1976.
10. Mills, A.L.; Breuil, C. & Colwell, R.R. — Enumeration of petroleum-degrading marine and estuarine microorganisms of the most probable number method. Can. J. Microbiol., 24:552-557, 1978.
11. Sohngen, N.G. — Benzin, petroleum, paraffinol und paraffin als kohlenstoff und energiequelle fur mikroben. Zbl. Bakt. II. Abt., 37:595-609, 1913.
12. Tison, F.; Devulder, B. & Tacquet, A. — Recherches sur la présence de mycobactéries dans la nature. Rev. Tuber. Pneumol., 32:893-902, 1968.
13. Vestal, A.L. — Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Atlanta, Department of Health Education and Welfare, U.S. Public Health Service, 1976.
14. Walker, J.D. & Colwell, R.R. — Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. Appl. Environ. Microbiol., 31:198-207, 1976.
15. Wolinsky, E. & Ryneanson, T.K. — Mycobacteria in soil and their relation to disease-associated strains. Amer. Rev. Resp. Dis., 97:1032-1037, 1968.

## **Informações Técnico-Científica SBM**

**Fraenkel-Conrat, H. & Wagner, R. K. eds. — Comprehensive virology. Structure and assembly: primary, secondary, tertiary and quaternary structures.** New York, Plenum Press, vol. 13, 652 p., 1979. US\$ 39.50.

O presente volume, complementação de uma série de volumes anteriores, faz parte de um conjunto de publicações críticas onde são expostos os conhecimentos mais recentes sobre vírus. Vários tópicos relacionados com as estruturas da partícula viral e com as seqüências de nucleótidos e aminoácidos são apresentados de modo pormenorizado, constituindo-se numa fonte de informações atualizadas para profissionais interessados em problemas de virologia animal, vegetal e bacteriana.

É uma excelente revisão que não pode deixar de fazer parte de uma biblioteca especializada em virologia. Todos os novos capítulos em que está dividida esta obra são de primorosa qualidade, parecendo-nos particularmente salientes o capítulo sobre a estrutura do RNA de vírus eucarióticos de autoria de Fraenkel-Conrat, o capítulo de Ginsberg sobre as proteínas estruturais dos adenovírus e o capítulo de Eiserling sobre a estrutura do bactériofago. Esta preferência é, obviamente ditada por nossos interesses, não havendo restrições a fazer aos outros capítulos, que como dissemos são de superior qualidade e do maior interesse.

Depois de passado o período descritivo da virologia, entra-se agora numa fase de novos conhecimentos, graças aos aperfeiçoamentos técnicos nos campos da biologia molecular, da genética, da espectroscopia e da microscopia. Atingiu-se o grau de maturação necessário para a virologia poder avançar por novos e excitantes caminhos, mesmo que as eminências em que hoje se encontra sejam, talvez, mais uma questão de perspectiva do que de posição absoluta. De qualquer modo este volume é uma valiosa fonte de informações, recomendável como elementos indispensável de consulta.

**José Alberto Neves Candeias**

*Departamento de Microbiologia e Imunologia*

*Instituto de Ciências Biomédicas USP*

*Caixa Postal 4365*

*01000 São Paulo SP*

**Kurylowicz, W., ed. — Antibióticos: uma revisão crítica.** Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 1981.

Esta interessante publicação corresponde a uma tradução de monografia originalmente surgida na Polônia. A partir de sua segunda edição, em inglês, datada de 1976, e atendendo a convite do editor (Prof. Kurylowicz) uma equipe da Universidade Federal de Pernambuco, liderada pelo Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima realizou a tradução brasileira. O Prof. Kurylowicz é Doutor Honoris Causa da mesma Universidade. O livro, após um capítulo introdutório sobre definição e aspectos históricos, estende-se em 4 outros capítulos sobre os aspectos metabólicos dos microrganismos em relação aos antibióticos, abrangendo sua biogênese, bioquímica e mecanismos de ação. São discutidas, as tentativas pa-

ra a classificação dos antibióticos e, a seguir, as implicações do seu emprego como agentes antimicrobianos incluindo discussões sobre a toxicidade, a farmacologia e indicações terapêuticas. Essa cobertura do assunto compreende a tradução realizada. Os dados revisados correspondem presumivelmente a mais de cinco anos pela data do original traduzido porém, com maior freqüência, têm mais de dez anos, a julgar pelas referências bibliográficas. De modo interessante, completo, e oportuno, a equipe de tradutores, a convite do editor, juntou dois capítulos complementares, específicos para a edição brasileira, resumindo a experiência do Instituto de Antibióticos da UFPe. Aí se incluem além de antibióticos, as substâncias antineoplásicas de origem microbiana ou vegetal. Uma relação de todos os trabalhos dessa destacada e operosa instituição científica brasileira acompanha a revisão. A obra com um total de 341 páginas está sendo distribuída pela Editora Guanabara Koogan.

Italo Suassuna

*Faculdade de Ciências Médicas UERJ  
Rua Manuel de Abreu, 48  
20551 Rio de Janeiro RJ*

**Day, R.A. — How to write and publish a scientific paper. Philadelphia, S. Press, 1979.**

Em 1975 Robert A. Day como "Managing Editor" da Sociedade Americana de Microbiologia, publicou um artigo sintético e primoroso, quase com o mesmo título do presente livro: "How to write a scientific paper. ASM News 41:486, 1975. Este artigo nos últimos anos tem servido de guia para quase todos os estudantes de pós-graduação e docentes em início de carreira com os quais temos tido contato, pois não nos furtamos à indicá-lo.

Surge agora sob a forma de livro com um aumento de páginas e de escopo (como escrever e publicar) um trabalho científico. O autor justifica esta versão aumentada dos seus ensinamentos anteriores, confessando ter recebido mais de 3.000 pedidos de separata, além de que o artigo foi reproduzido em quase uma dezena de outras publicações e traduzido para o espanhol e o japonês.

O livro constitui-se de 26 capítulos que vão desde aspectos conceituais sobre o relato científico, passam pela análise de cada parte que compõem um artigo (introdução, material e métodos, resultados, resumo, etc.) até informações de natureza técnica (como preparar as ilustrações, tabelas, etc.).

A preocupação do autor é grande e útil no que se relaciona com a boa linguagem. Infelizmente, mas obviamente, só coube serem apontados o mau emprego e os erros no referente à língua inglesa. Assim mesmo cabe destacar conceitos como: "se bem que a boa escrita não conduz à publicação de má ciência, a má escrita pode, e com freqüência consegue, impedir ou retardar a publicação da boa ciência".

Sobre o valor de um relato científico comenta: "Os cientistas, a começar com estudantes graduados, são primariamente avaliados, não pela sua habilidade em técnicas de laboratório, não pelo seu conhecimento natural de um campo científico de amplitude maior ou menor; e, certamente, não pela sua esperteza ou simpatia; eles são apreciados e se tornam conhecidos (a não permanecerem desconhecidos) pelas suas publicações".

Por isso, o propósito do livro é ajudar a todos os investigadores e estudantes de ciências (com ênfase maior, todavia, em relação à biologia) a preparam manuscritos que tenham grande probabilidade de serem aceitos para publicação e de serem bem entendidos, uma vez publicados.

Recomendamos como extremamente útil e até divertida a leitura do livro, pois o autor preocupa-se em descrever algumas anedotas, suficientemente jocosas, à guisa de exemplos, na discussão de certos itens.

Italo Suassuna

*Faculdade de Ciências Médicas UERJ  
Rua Manuel de Abreu, 48  
20551 Rio de Janeiro RJ*

Petricciani, J.C.; Hopps, H.E. & Chapple, P.J. — **Cell substrates: their use in the production of vaccines and other biologicals.** New York, Plenum Press, vol. 118, 220p., 1979. US\$ 212.000.

O conteúdo do presente livro foi preparado com apresentações feitas no 2º Simpósio Anual sobre Utilização de Substratos Celulares no Preparo de Vacinas e outros Produtos Biológicos, realizado em 1978, em Lake Placid, Nova York.

Esta publicação aborda temas essencialmente práticos relativos à utilização de substratos celulares na produção de vacinas e outros produtos biológicos, como interferon, recombinantes de DNA, uroguinase e uma multiplicidade de compostos com potencialidades comerciais, obtidos de culturas de células vegetais; ao mesmo tempo são feitas considerações éticas e filosóficas, sendo de salientar as apresentações de Cooke e Duff, que consideramos excelentes. Não é de menor interesse o capítulo dedicado a considerações, no campo da Saúde Pública, sobre biologia molecular onde são analisadas as contribuições da virologia para uma melhor compreensão dos mecanismos de síntese protéica e para os estudos de biosíntese da membrana celular. Não concordamos totalmente com as considerações de Wagner, autor do capítulo sobre biologia molecular e Saúde Pública de que serão sornente pesquisas a nível molecular as que melhores dividendos poderão dar na solução de problemas médicos, melhores e mais proveitosos do que os que podem advir do que o autor chama de "cruzadas emocionais". Evidentemente, muitas das descobertas filhas de uma linha de pensamento orientado para a exploração de sistemas simples postos à nossa disposição pela natureza vieram a ter vasta e capitais aplicações. Mas não se vê muito bem que uma sugestão, só por vir de quem se preocupe com a solução científica de um problema de interesse humano, escravize o investigador a quem lhe negue a fonte de originalidade, a quem lhe tolha o desejo de alistar-se numa "cruzada emocional".

Os quatro capítulos iniciais, que resumem uma visão geral sobre substratos celulares, é de excelente qualidade didática.

Trata-se de um livro útil para interessados no campo das culturas celulares e suas aplicações, interessados com ou sem maior experiência, fornecendo ao mesmo tempo para estudantes de biologia e microbiologia, subsídios de ponderável valor.

José Alberto Neves Candeias  
*Dept.º de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas USP  
Caixa Postal 4365  
01000 São Paulo SP*

Rose, A.H., ed. — *Economic microbiology. Vol. 5 — Microbial enzymes and bioconversions.* New York, Academic Press, 1980.

Este é o quinto volume de uma nova série editado por A.H. Rose.

Neste volume, bem como nos anteriores, cada tópico é abordado por um autor diferente, o que torna heterogênea a leitura de cada capítulo.

Além de um capítulo introdutório magnificamente descrito pelo editor sobre as seqüências históricas da descoberta, bioquímica, função e emprego das enzimas, os demais capítulos são: 2. Proteinases; 3. Amilases, amiloglucosidases e glucanases; 4. Glucose oxidase; glucose desidrogenase; glucose isomerase,  $\beta$ -galactosidase e invertase; 5. Enzimas pecticas; 6. Celulases; 7. Enzimas imobilisadas; 8. Conversão de esteróides; 9. Acilases penicilínicas e  $\beta$ -lactamases; 10. Conversão de alcalóides e 11. Transformações microbianas de antibióticos.

Como pode ser observado, as principais enzimas empregadas industrialmente foram abordadas (Cap. 2 a 7), bem como as transformações dependentes de várias enzimas ou da própria atividade metabólica dos microrganismos (Cap. 8 a 11).

O grau de profundidade e extensão variou de capítulo para capítulo; em todos porém, os autores deram ênfase as aplicações e suas perspectivas do ponto de vista industrial. O único capítulo que nos pareceu distoante foi o de conversão de alcalóides; neste, o autor não fez uma distinção entre transformações químicas que resultam num produto de interesse comercial ou simplesmente vias metabólicas utilizadas pelos microrganismos na degradação ou síntese de novos componentes. Em consequência, surgem inúmeras fórmulas ou nomes químicos complexos que não contribuem para a clareza do texto.

No conjunto, este volume serve como excelente fonte de referências para pesquisadores e técnicos que trabalham em indústrias químico-farmacêuticas, alimentos, cosméticos, têxtil, bem como a docentes em Universidades.

Flavio Alterthum  
Instituto de Química USP  
Caixa Postal 20780  
01000 São Paulo SP

### PRÊMIO SBM-BECTON, DICKINSON

A Sociedade Brasileira de Microbiologia de acordo com o Protocolo de Cooperação Institucional firmado com a Becton, Dickinson, está distribuindo o "Prêmio SBM/Becton, Dickinson", ao melhor trabalho publicado na Revista de Microbiologia, vol. 12(1-4), 1981.

Para isso, foi composta uma Comissão Julgadora, coordenada pelo Dr. Darcy F. de Almeida, da UFRJ, Dr. Luiz Renato Caldas e Ana Maria Abrantes Coelho.

Inicialmente, foram selecionados, num exame preliminar 14 artigos, numerados de acordo com julgamento. Num segundo turno, os artigos foram classificados em três grupos denominados de A, B e C, em ordem decrescente de qualidade, sendo desprezados os integrantes do grupo C. Os 5 artigos do grupo A e os 3 artigos do grupo B, foram reexaminados, sendo selecionados 3 artigos para avaliação final, segundo os seguintes critérios:

Artigo nº	Idéia	Produto	Total
1	86	33	119
5	75	30	105
7	84	29	113

Nestas condições, foi considerado como vencedor o artigo de autoria de Jan Dirk van Elsas e Elisa G.C. Penido, publicado no vol. 12(2):48-54, 1981:  
"Characterization of phages of *Bacillus subtilis* isolated from Brazilian soils".  
"Caracterização de fagos de *Bacillus subtilis* isolados de solos brasileiros".

Aos autores, foram emitidos os títulos correspondentes ao Prêmio SBM/Becton, Dickinson.