

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 14 Número 1 Jan.-Mar. 1983

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^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviaturas 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 nano (n) e pico (p), ao invés de milímicrom (m μ); microm (μ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm; 10 $^{-6}$ m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm; 10 $^{-9}$ m), ao invés de milímicro (m μ); e Angstroms (Å; 10 $^{-10}$ m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros (μg/ml) ou microlitros por litro (μlitos/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^a 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 do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

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

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

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:
Miller, S. E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

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

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na 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, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas 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.



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\$ 9.000,00 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.

Impressão Gráfica Editora Hamburg Ltda.

Pertence à:
REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1274
Cid. Universitária - USP
05508-900 — São Paulo/SP

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente João S. Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Secretário Geral Maria Therezinha Martins CETESB Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 05459 São Paulo SP
	Vice-Presidente Paulo Pinto Gontijo Filho Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ	Tesoureiro Milton Mangini 01000 São Paulo SP

Objetivos A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agrupar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes.
Organiza, 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.
EMBRABIO - Empresa Brasileira de Biotecnologia e Representações Ltda.

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.cjb.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 14 JANEIRO-MARÇO 1983 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 14(1)

	CONTEÚDO	CONTENTS
Edyr Rogana & Valter R. Linardi	1 Influência de meios de cultura e do pre-tratamento de substratos celulósicos na produção de celulase por <i>Trichoderma reesei</i> QM 9414	<i>Influence of culture media and pretreatment of cellulosic substrates in the production of cellulase by Trichoderma reesei QM 9414</i>
José Otamar F. de Moraes Janete M. de Araújo Eugênia M. Rios & Berenilda R. de Mello	6 Isolamento de <i>Zymomonas mobilis</i> em mostos de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais	<i>Isolation of Zymomonas mobilis from industrial fermenting sugarcane juice musts</i>
Selma G.F. Leite Francisca P. de França & Carlos Augusto de L. Oliveira	11 Teores de proteínas e ácidos aminados em células de <i>Chlorella homosphaera</i> , cultivadas em diferentes fontes de nitrogênio	<i>Protein and aminoacids content of Chlorella homosphaera in different nitrogen sources</i>
José P. de Siqueira Júnior & João Lúcio de Azevedo	16 Indução de prófagos pela 8-methoxipsonaleina associada à luz ultravioleta longa em <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Induction of prophage by 8-methoxypsonalein plus near UV light in Staphylococcus aureus</i>
Maria Helena do C. Lagrota Márcia D. Wigg Luiz Octávio B. Pereira Maria Evangelina F. Fonseca Nuno A. Pereira & João C. Guimarães	21 Atividade antivirótica do lapachol	<i>Antiviral activity of lapachol</i>
Rosalvo Guidolin Mário C. Baltazar & Flávio Zelante	27 Produção da vacina anti-rábica veterinária em suspensão de células BHK	<i>Veterinary antirabic vaccine production in BHK cells suspension</i>

Marcelo Magalhães & Marlene Andrade	36	Eficácia do meio Y para recuperação de <i>Shigella flexneri</i> de fezes	Efficacy of the Y medium for recovery of <i>Shigella flexneri</i> from stools
Fernando Cordeiro & Catherine R. Sulzer	38	<i>Leptospira interrogans</i> , sorovar copenhageni, isolado de cão em Belo Horizonte	<i>Leptospira interrogans</i> , serovar copenhageni, isolated from a dog in Belo Horizonte, Brazil
Maria Helena F. Saad Elsa F.R. de Oliveira & Italo Suassuna	42	Avaliação de métodos "in vitro" para estudo da atividade da associação de gentamicina e carbenicilina em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	An evaluation of "in vitro" methods for studying the combined activity of gentamicin and carbenicillin on <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Antonio F.P. de Castro Lucila C. Ricci Aparecida C.P. de Almeida Margaretti S. Oliveira & David E.S.N. de Barcellos	48	Fatores de virulência em <i>Yersinia enterocolitica</i> isolada de suínos	Virulence factors of <i>Yersinia enterocolitica</i> isolated from pigs
Informação Técnico-Científica SBM	55		

INFLUENCE OF CULTURE MEDIA AND PRETREATMENT OF CELLULOSIC SUBSTRATES IN THE PRODUCTION OF CELLULASE BY TRICHODERMA REESEI QM 9414

Edyr Rogana

Deptº de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas UFMG
Caixa Postal 2486
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

& Valter Roberto Linardi

Deptº de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Summary

Untreated maize straw is shown to be a better substrate for cellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414 than sugar cane bagasse, journal waste and rice straw either untreated or boiled with 4% NaOH for 15 min. In all experiments Mandels & Reese medium was used, in which microcrystalline cellulose was replaced by cellulosic wastes.

Resumo

Influência de meios de cultura e do pretratamento de substratos celulosicos na produção de celulase por *Trichoderma reesei* QM 9414

A palha de milho natural foi o melhor substrato na produção de celulase por *Trichoderma reesei* QM 9414, quando comparada com bagaço de cana, papel de jornal ou palha de arroz, naturais ou tratados com solução de NaOH a 4% por 15 min. à temperatura de ebulição. Nos experimentos usou-se o meio de Mandels & Reese, no qual a celulose microcristalina foi substituída por resíduos celulosicos.

Introduction

Cellulose is the most abundant organic material which can potentially be used as a source of food, fuel and chemicals. Thousands of microorganisms have the ability to grow on cellulose. Although many grow quite rapidly, only a few produce extracellular cellulase capable of converting crystalline cellulose into glucose *in vitro*. Cell free culture filtrates of *Trichoderma reesei*, formerly *T. viride* (12), have the ability to hydrolyze crystalline cellulose into soluble sugars (9).

The degradation of crystalline cellulose is a complex process, requiring the participation of many enzymes. There are at least three different types of cellulolytic activity: exo- β -1,4-glucanase, endo- β -1,4-glucanase and β -glucosidase (2).

Recently, there has been some interest in the possibility of enzymatic conversion of cellulose into glucose on commercial scale. Cel-

-lases are produced by surface culture methods, but the high price of the enzymes precludes their use in the biotechnical process industry. Research work has been done to develop industrial cellulase production by submerged fermentation. The production is note economical, at present, but improvement of microbial strains and process optimization are expected (2).

In this paper the production of cellulases by *Trichoderma reesei* QM 9414 on maize straw is reported and compared with the use of other cellulosic substrates.

Material and Methods

Cultural - *Trichoderma reesei* QM 9414, was kindly sent by Dr. E.G. Simmons (University of Massachusetts, USA). Stock cultures were stored at 24°C on 10ml Potato-Dextrose-Agar (PDA) slants. The innocula were prepared by suspending the spores from PDA slant in 10ml of distilled water. An aliquot of 0.5ml was used to inoculate a 100ml culture medium in 500ml erlenmeyer flasks. Four culture media were tested: Czapeck (5), Eggins (1), Basic Liquid (10) and Mandels & Reese (8) containing 1.0% microcrystalline cellulose, Sigma, ball milled for 24h, as the carbon source. In further experiments, Mandels & Reese medium was used. Microcrystalline cellulose was replaced by rice straw, sugar cane bagasse or maize straw, all of them passed through a 20 mesh screen, and journal paper cut in small pieces. These cellulosic substrates were either submitted to alkali treatment or not (3). Incubation was carried out on a rotative shaker at 140rpm and 25°C. A large scale experiment was carried out in a 14 liter fermentor equipped with a pH control unit. These vessels contained 10 liter of Mandels & Reese medium with maize straw as the carbon source. The fermentation conditions were: sparge rate, 2 liter/min; temperature, 27°C; agitation, 300rpm with three impellers of 8cm in diameter (14). The fermentor was inoculated with *Trichoderma reesei* growing in 200ml of Mandels & Reese medium. Incubation was run for six days. Soy bean oil was used as anti-foam. The pH was not controlled during the fermentation. All the media were sterilized at 121°C for 15min except for the fermentation medium whose time of sterilization was 30min.

Enzyme assays - In the experiments with rotative shaker, the cellulase activity was determined as the activity on filter paper (FP-cellulase) after three to six days of incubation, according to Peitersen (11). To 100mg Whatman nº 1 filter paper, 1.5ml sodium citrate buffer, pH 4,8, and 0.5ml of the sample were added. The mixture was incubated for 30min at 50°C and the liberated reducing sugars were measured as glucose by the dinitrosalicylic acid (DNS) methods (16). The filter paper activity was expressed as 1mg of glucose produced by 1ml of sample. Correction for enzyme blanks were made. In the experiment with the fermentor, cellulase activity was determined as filter paper activity. The protein in the culture medium was determined after precipitation in 5% trichloracetic acid, and measured by the Lowry method (6). The assays for FP-cellulase and extracellular protein were performed every 12 hours during 120 hours of fermentation.

Results and Discussion

Among the media tested, the production of FP-cellulase in submerged fermentation was obtained only with Mandels & Reese medium, although mycelial growth was observed in other media. That medium contains ammonium sulfate, urea and peptone as nitrogen sources. Peptone has been described as decreasing the lag phase in growth and enzyme

production on cellulose (14). These organic substances are not present together in other media. The absence of micronutrients such as calcium and cobalt and of organic nitrogen must be responsible for the lack of production of cellulases in other media.

Many articles and reviews concerning the use of treated or untreated sugar cane bagasse (13), rice straw (4) and waste paper (7) have been used as suitable carbon source for cellulase producing microorganisms.

Table 1 shows that untreated maize straw was a better carbon source than those mentioned above as far as FP-cellulase yield is concerned. Untreated rice straw did not lead to the production of FP-cellulase. Pretreatment of substrates increased the production of this enzyme, except in the case of maize straw (Table 1). The FP-cellulase promoting effect of the alkaline treatment could have been due, among other possibilities, to the removal of inhibitory substances, to the production of soluble carbohydrates that are readily digested by organisms or to eventual changes in the structure of cellulose fiber (3). According to Han (4), untreated rice straw contains 0.67% of nitrogen, 29.8% of crude fiber and 15.8% of silica. The alkali treatment removes about half of the silica, probably of solubilization of amorphous silica (4). It may be that the presence of silica in untreated rice straw was responsible for the lack of production of FP-cellulase. We have no explanation for the reduction of activity when pretreated maize straw was used.

However, when microcrystalline cellulose was used as the carbon source (Table 1), it is a better production of cellulases when compared with maize straw was obtained. This difference was expected because the maize straw was not milled, but only passed through a 20 mesh screen. On the other hand, maize straw has a structure and chemical composition different from crystalline cellulose. This difference in cellulase production suggests that better conditions must be investigated for maize straw.

In the experiments carried out on fermentor with 1% untreated maize straw, the maximum yield of FP-cellulase was 2.0U/ml after 96 hours of fermentation, the same data was obtained for extra-cellular protein, as shown on Figure 1.

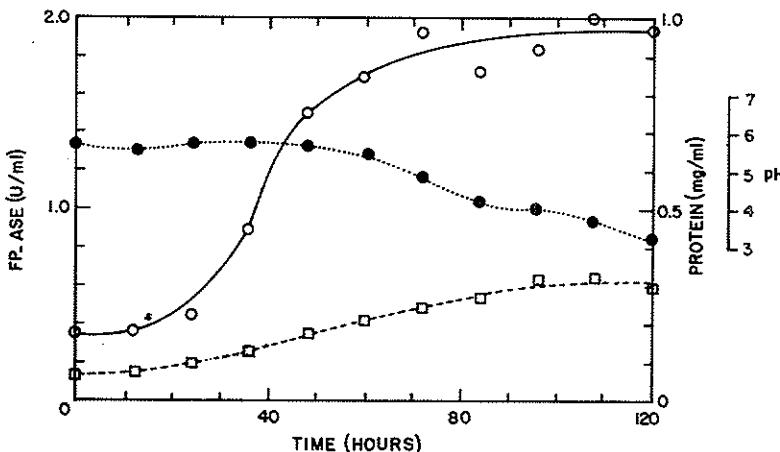
Table 1 - Influence of different untreated and pretreated substrates on the production of FP-cellulase by *Trichoderma reesei*

Incubation days	Cellulosic Substrates								
	Cellulose (U/ml) ^a	Rice straw (U/ml) ^a	Sugar bagasse (U/ml) ^a	Maize straw (U/ml) ^a		Journal paper (U/ml) ^a			
U	U	P	U	P	U	P	U	P	
3	0.88	0	0.13	0.36	0.25	0.73	0.41	0.25	0.44
4	1.69	0	0.22	0.36	0.55	0.86	0.35	0.33	0.45
5	1.93	0	0.41	0.50	0.93	1.11	0.40	0.46	0.63
6	2.52	0	0.38	0.50	1.10	1.36	0.49	0.48	0.66

a. Filter paper activity was expressed as 1mg of glucose produced by 1ml of sample;
U. Untreated substrates; P. Pretreatment of substrates by boiling with 4% NaOH for 15 min.

Experiments in duplicates were carried out in 500ml flasks on a rotary shaker with Mandels & Reese medium, in further experiments microcrystalline cellulose was replace by cellulosic substrates.

Figure 1 - Production of FP-ase on fermentor



FP-ase ○—○; Extra-cellular protein □---□ and pH ●··●.
Experiments carried out on fermentor with 1.0% untreated
maize straw as the carbon source.

On a rotary shaker, the maximum yield of 1.36U/ml was obtained after 144 hours (Table 1). One can infer from the data that the process carried out on a fermentor gives a better yield of enzymes and accelerates their production.

The pH at the end of the fermentation was 3.3, within the range of 3.0-4.0, reported by Sternberg (14) for maximal cellulase production in a medium containing 2% cellulose.

This report shows that maize straw is a good carbon source for cellulase production by *Trichoderma reesei* QM 9414. Experiments on fermentor shows that pretreatment is not required and that pH adjustment is not necessary.

In summary among the media used, the Mandels & Reese was the best. On a rotary shaker cellulose showed be better than maize straw as a carbon source for cellulase production. Among the cellulose wastes used, the maize straw was the best substrates. Other concentrations of maize straw and its chemical or physical treatment must be investigated.

Acknowledgement

The authors thank Dr. E.C. Vieira and Dr. J. Nicoli, for their review and suggestion about this manuscript. The technical assistance of Mr. N.C. Vital was greatly appreciated. This work was supported by FINEP Microbiologia II and CNPq.

References

1. Eggin, W.O.H. & Pugh, G.J.F. - Isolation of cellulase decomposing fungi from soil. *Nature*, 193:94-95, 1962.
2. Enari, T.M. & Markkanen, P. - Production of cellulolytic enzymes by fungi. *Adv. Biochem. Eng.*, 5:2-48, 1977.

3. Han, Y.W. - Microbial fermentation of rice straw: nutritive composition and *in vitro* digestibility. *Appl. Microbiol.*, 29:510-514, 1975.
4. Han, Y.W. & Callihan, C.D. - Cellulase fermentation: effect of substrate pretreatment on microbial growth. *Appl. Microbiol.*, 27:159-165, 1974.
5. Hudson, H.S. - Fungal sprophytism. 2.ed. London, William Cloves, 1974.
6. Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1971.
7. Mandels, M.; Hontz, L. & Nystrom, J. - Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechnol. Bioeng.*, 16:1471-1493, 1974.
8. Mandels, M. & Reese, E.T. - Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, 73:269-278.
9. Mandels, M. & Weber, J. - The production of cellulases. *Adv. Chem. Ser.*, 95:391-414, 1969.
10. Menezes, T.J.B.; Lamo, P.R. & Arakaki, T. - Isolamento e seleção de microrganismos produtores de celulase. *Colet. Inst. Tecnol. Alim.*, 7:83-90, 1976.
11. Peitersen, N. - Cellulase and protein production from mixed cultures of *Trichoderma viride* and a yeast. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:1291-1299, 1975.
12. Simmons, E.G. - International Mycological Congress, 29, Tampa, Florida, 1977.
13. Srinivasan, V.R. & Han, Y.W. - Utilization of bagasse. *Adv. Chem. Ser.*, 95:447-460, 1969.
14. Sternberg, D. - A method for increasing cellulase production by *Trichoderma viride*. *Biotechnol. Bioeng.*, 18:1751-1760, 1976.
15. Sternberg, D. - Production of cellulase by *Trichoderma*. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6:35-53, 1976.
16. Sumner, J.B. - The determination of sugar in diabetic urine using dinitroisalicylic acid. *J. Biol. Chem.*, 62:287-290, 1925.

ISOLAMENTO DE *ZYMMOMONAS MOBILIS* EM MOSTOS DE CALDO DE CANA DE FERMENTAÇÕES ALCOÓLICAS INDUSTRIALIS

José Otamar Falcão de Moraes
 Janete Magali de Araújo
 Eugênia Maranhão Rios
 & Berenilda Ramalho de Mello

Deptº de Antibióticos, Universidade Federal de
 Pernambuco
 Cidade Universitária
 50000 Recife PE, Brasil

Resumo

De 9 amostras de mostos de caldo de cana de fermentações alcoólicas industriais, realizadas em destilarias de álcool e de aguardente, 5 permitiram o isolamento de 6 cepas de *Zymomonas mobilis*. O método de isolamento seguido constava de centrifugação, semeadura do sobrenadante em meios líquidos de enriquecimento, passagens em meios líquidos com 5 e 15 unidades/ml de penicilina e plaqueamento e incubação a 28-30°C, de preferência em anaerobiose.

Summary

Isolation of Zymomonas mobilis from industrial fermenting sugarcane juice musts

From 9 samples of fermenting sugarcane juice musts of Plants of alcohol and brandy ("aguardente") 5 allowed the isolation of 6 *Zymomonas mobilis* strains. The isolation method involved was: centrifugation in order to separate most of yeasts cells; inoculation of the supernatant to enrichment broths; transfer of the growth to penicillin broths (with 5 and 15 units/ml) and, finally, isolation and purification by plating and incubation in anaerobic rather than aerobic condition at 28-30°C.

Introdução

Entre as bactérias contaminantes das fermentações alcoólicas industriais são citados, comumente, os gêneros *Lactobacillus* Beijerinck 1901, *Leuconostoc* van Tieghem 1878, emend. Hucker & Pederson 1930, *Clostridium* Prazmowski 1880 e *Acetobacter* Beijerinck 1898. Não foram encontradas referências a representantes do gênero *Zymomonas* Kluyver & van Niel 1936, embora, pela sua natureza, devesse esperar que essas bactérias estivessem presentes nos mostos de caldo de cana e de melaços, ao lado dos demais microrganismos sacarófilos habituais.

Gonçalves de Lima & col. (4) isolaram cepas de *Zymomonas mobilis* da bebida popular "caldo de cana picado", mas não tentaram o isolamento de mostos industriais.

O isolamento de *Zymomonas* não é tarefa das mais fáceis (3), apesar de essas bactérias não serem exigentes quanto à nutrição e de se

desenvolverem com facilidade, em anaerobiose ou mesmo aerobicamente, em meios artificiais glicosados providos com extrato de levedura.

A falta de referências a *Zymomonas* como acompanhantes habituais das leveduras, nas fermentações alcoólicas industriais, se deve provavelmente à relativa dificuldade que o microbiologista não especializado no assunto, experimenta nas tentativas iniciais de isolamento. A detecção da numerosa ocorrência de leveduras e bactérias contaminantes mais frequentes exige certa persistência, além de uma metodologia apropriada, para o isolamento de *Zymomonas*.

Neste trabalho é relatado o isolamento de seis cepas diferentes de *Zymomonas*, a partir de cinco amostras de mostos, em um total de nove manipuladas.

Material e Métodos

Fontes de bactérias - Mostos de caldo de cana, colhidos de dornas de fermentação em destilarias de álcool ou de aguardente. Geralmente, o material era colhido antes de se completar o volume da dorna ou ao se completar esse volume, quando a fermentação estava ainda em fase tumultuosa. Sempre que possível o trabalho de isolamento era iniciado durante os dois primeiros dias após a colheita das amostras.

Meios de cultura - Meios de enriquecimento - 1. Caldo de cana clarificado e enriquecido: a um litro de caldo fresco, juntar a clara de um ou de dois ovos; agitar e aquecer a vapor fluente durante 15 minutos; filtrar e refazer o volume de 1 litro com água destilada; juntar extrato de levedura, 5g; pH final aproximado, 5,0; 2. Melão de cana, 10g; glicose, 25g; PO₄H₂K₂, 1g; SO₄(NH₄)₂, 1g; água potável, 1 litro, pH final aproximado, 5,0.

Meios para isolamento - 3. Meio "1" com 1,5% de agar; 4. Meio "2" com 1,5% de agar; 5. Meio "standard" de Swings & De Ley (6): glicose, 20g; extrato de levedura, 5g; água potável, 1 litro; pH aproximado 6,5; agar 1,5%; 6. Meio "5" adicionado de PO₄H₂K₂, 1g; SO₄(NH₄)₂, 1g. Para se detectar acidificação, pode-se usar qualquer um dos quatro últimos meios, adicionando-se carbonato de cálcio em pó, 10g/l.

Meios para produção de formas pleomórficas (filamentosas) de *Zymomonas* - 7. Mosto de melão de cana com 15 a 20°Brix, 1 litro; PO₄H(NH₄)₂, 1g; SO₄Mg.7H₂O, 0,2g; pH aproximado 5,0; 8. Meio "7" com 1,5% de CO₃Ca em pó; 9. Meio "7" com 1,5% de agar; 10. Meio "8" com 1,5% de agar.

Meios para manutenção de culturas - 11. Meio "1", diluído a 1/4, com água destilada e adicionado de 10g/l de CO₃Ca em pó; 12. Meio "2" adicionado de 10g/l de CO₃Ca em pó. Os meios "11" e "12" podem ser adicionados de 2 a 3ml/tubo, de óleo mineral refinado ou parafina líquida.

Técnicas analíticas - O etanol, na fase inicial, ainda nas fermentações em tubos de ensaio, pode ser qualitativamente caracterizado em alguns mililitros de destilado, observando-se o odor típico e/ou fazendo-se os testes do iodoformio, do acetato de etila e o de Berthelot (5). O CO₂, na ausência de H₂S, pode ser reconhecido facilmente por absorção por uma base forte, fazendo-se fermentação com uso de tubo de Durham e/ou recolhendo-se o gás em água de cal ou de barita.

Método de isolamento - A amostra de mosto era centrifugada a cerca de 1000r.p.m., durante 10 minutos, para obtenção de um vinho sobrenadante que continha a maior parte das bactérias e o mínimo possível de células de leveduras. O sobrenadante era usado para inoculação de meio(s) de enriquecimento (1 a 2ml de vinho para 10ml de meio) e os

tubos eram incubados a 28-30°C, sem precaução de anaerbiose. Havendo fermentação, fazia-se observação microscópica e centrifugava-se ou não, conforme a presença de leveduras fosse grande ou pequena. Inoculava-se novo tubo com meio de enriquecimento. Continuava-se o processo até obtenção de uma população bacteriana grande (revelada por observação microscópica), com presença cada vez maior de células com as características morfológicas de *Zymomonas*. Neste ponto, cultivava-se a mistura em meios de enriquecimento adicionados de penicilina (utilização de penicilina G potássica, em concentrações de 5 e de 15 unidades/ml, nos meios). Esta providência eliminava as bactérias Gram-positivas sensíveis ao antibiótico, das quais as mais frequentes eram dos gêneros *Leuconostoc* e *Lactobacillus*. Assegurada a presença de bactérias zimomonoides e de fermentação, partia-se do último cultivo para o isolamento em placas. Usavam-se, de preferência, dois meios diferentes: um com sacarose (meio 3 ou meio 4) e um sem sacarose (meio 5). Geralmente, esses meios eram usados com e sem carbonato de cálcio e com e sem penicilina.

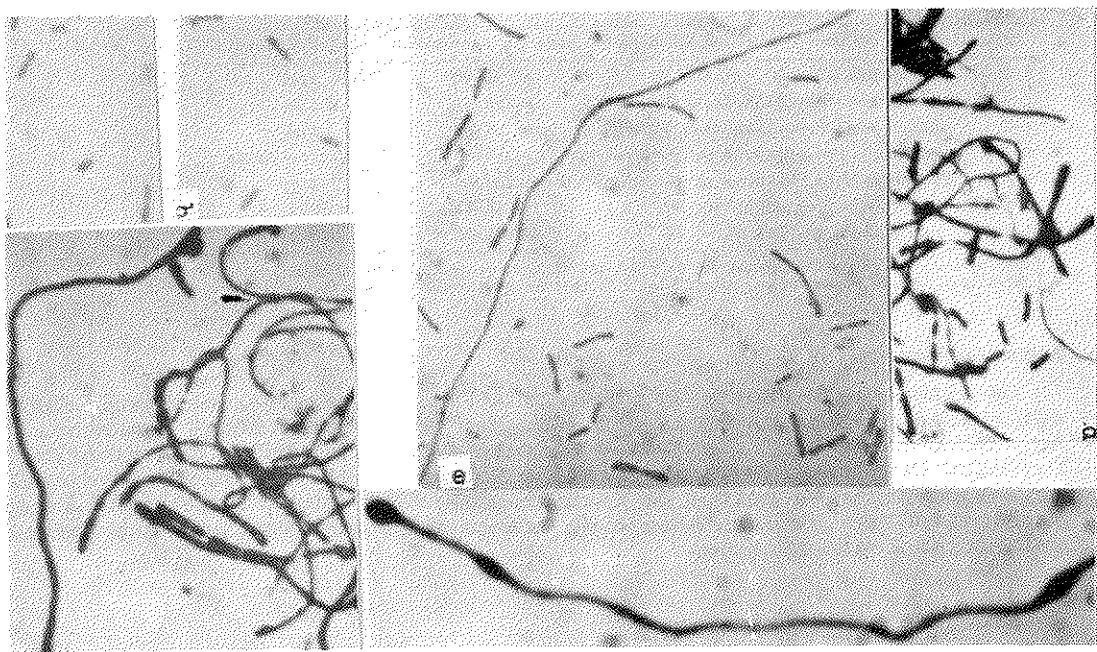
Resultados e Discussão

Morfologia das colônias - Em meios contendo sacarose as colônias de *Zymomonas* são circulares, lisas, de cor creme ou de cor do meio (em melaço, por exemplo, elas são, aproximadamente, cor de chocolate), de consistência pastosa. Às vezes, principalmente em meios com caldo de cana, o crescimento é espalhado, confluente, formando um "mingau", provavelmente levana (2), que atinge os bordos e, mesmo, a tampa da placa, como acontece com *Leuconostoc*. Isto leva a se indagar se a produção de "canjica" atribuída, comumente, a contaminação de fermentações por *Leuconostoc mesenteroides*, não poderia ser, também, resultado da produção de levana por *Zymomonas*. Em meios desprovvidos de sacarose, nos quais havia glicose, as colônias são pouco elevadas, circulares, piriformes ou às vezes, apresentam uma dilatação central e extremidades afiladas, lembrando um fuso. Aquelas desenvolvidas no interior do meio são lenticulares ou se espalham como um círculo nebuloso, com uma bolha de gás oclusa. Nos meios que contêm carbonato de cálcio as colônias apresentam halo transparente, causado pela produção de ácidos que, segundo Gonçalves de Lima & col. (3) e Lindner, citado por Swings & De Ley (6), podem ser láctico, acético e succínico.

Morfologia celular - Bastonetes Gram-negativos (Fig. 1), com 2 a 6 μm de comprimento e diâmetro de 1 a 1,4 μm , geralmente ligados polarmente, formando pares; na maioria das vezes móveis (só uma das amostras de mosto permitiu o isolamento de uma variante imóvel, ao lado de uma móvel). Em mosto de melaço (meio 7) ou em melaço agar (meio 9) as células, inicialmente "normais", podem dar origem, ao envelhecerem, a formas pleomórficas, constituídas de filamentos longos, com 10 a 80 μm de comprimento, ou mesmo mais, apresentando, geralmente, uma típica dilatação nas extremidades. Este pleomorfismo é mais acentuado se a incubação se dá a 35-37°C. Note-se que formas semelhantes foram vistas por Barker & Hillier, quando, em 1911, isolaram, a partir de sidra deteriorada, o que Swings & De Ley (6) referem como sendo a primeira cultura pura do gênero *Zymomonas*, chamada por Barker & Hillier "cider sickness organism".

Fermentação alcoólica - A partir de meios glicosados artificiais ou de meios à base de caldo de cana, ou de melaço, todas as culturas isoladas originaram fermentação alcoólica, com rendimentos próximos aos obtidos com leveduras industriais, sob as mesmas condições experimentais.

Figura 1 - *Zymomonas mobilis*



a e b - Células "normais". Cultivo 48h, caldo "standard" (6), Gram, 1270x; c e d - Cel. pleomórficas, colônias 6 dias, agar melaço (meio 9), cristalvioleta, 1270x; e - Cel. alongadas, cultivo 48h, mosto de melaço (fim de fermentação), Gram 1200x; a e e - cepa Z-1; f - cepa Z-3, mosto de melaço, 48h, 37°C, 1923x.

Odor - As colônias de todas as culturas revelaram um odor de fruta, *sui generis*. Os cultivos em meios líquidos apresentavam um odor que lembra muito o de pitomba (*Talisia esculenta* Radlk.).

Resistência a meios com pH baixo - Todas as culturas se desenvolveram em meio com pH 4,0.

Temperatura máxima para desenvolvimento e fermentação - Um aspecto particular das cepas isoladas, foi a capacidade de se multiplicarem e de fermentarem a 39-39,5°C. A temperatura ótima para elas, porém, se situou em torno de 35°C. Essa resistência térmica está coerente com os ambientes de onde provêm, pois, nas fermentações industriais, em Pernambuco, é comum que a temperatura chegue a 38°C ou até um pouco mais, principalmente em destilarias de baixo nível tecnológico.

Os melhores resultados no isolamento foram obtidos em incubações sob anaerobiose (sistema GasPak), pois, aí, as colônias de *Zymomonas* de mesma idade, eram maiores, quando comparadas com as desenvolvidas em aerobiose e, o que era mais importante, evitava-se o desenvolvimento perturbador de bactérias aeróbias acetificantes.

Em resumo, a conduta mais indicada, na fase final de isolamento, foi: meios com carbonato de cálcio e penicilina, e incubação anaeróbia, à temperatura de 28-30°C, durante 5 a 6 dias.

De nove amostras de caldo de cana em fermentação que foram trabalhadas, cinco permitiram o isolamento de bactérias diagnosticadas (Tabela 1), presumivelmente, como do gênero *Zymomonas* Kluyver & van Niel, 1936 (1). Esse diagnóstico se baseou em informações da literatura (1, 3, 4, 6) e na opinião dos autores, no trato com essas bactérias.

Tabela 1 - Dados de interesse sobre as cepas de *Zymomonas* isoladas

Cepa	Fonte do mosto de caldo de cana	Data do isolamento	Células móveis?
Z-1-80	Usina Massauassu, Escada, PE	15.05.80	Sim
Z-2-80	Usina não identificada, SP	17.08.80	Sim
T-2	Usina Massauassu, Escada, PE	20.10.80	Sim
P-3	Engenho Pitu, Vitória de S.Antão,PE	24.10.80	Não ou raras
P-4	Engenho Pitu, Vitória de S.Antão,PE	24.10.80	Sim
Z-1-81	Usina Bulhões, Jaboatão, PE	05.01.81	Sim
Z-1-81A	Usina Bulhões, Jaboatão, PE	05.01.81	Sim

Obs: Testes posteriores indicam que Z-1-81 e Z-1-81A são provavelmente, a mesma cepa; apenas Z-1-81 foi isolada de uma colônia superficial e Z-1-81A de uma colônia profunda, em outra placa.

Agradecimentos

Os autores são gratos ao Prof. Dr. Oswaldo Gonçalves de Lima pelo estímulo e pela experiência que lhes tem transmitido sobre *Zymomonas*. Agradecem também a Thales Velho Barreto de Araújo, Maria das Vitórias Carneiro Cavalcanti e Maria Cristina Soares da Silva, pelo fornecimento das amostras de mostos de fermentações; e aos laboratoristas Albérico Nascimento Reis, Wilson Araújo de França e Gerson Francisco dos Santos pela colaboração técnica.

Referências Bibliográficas

1. Carr, J.C. - Genus *Zymomonas* Kluyver & van Niel 1936, 399. In: - Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 352-353, 1974.
2. Dawes, E.A; Ribbons, D.W. & Rees, D.A. - Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. Biochem. J., 98:804, 1966.
3. Gonçalves de Lima, O.; Larios, C. & Azcarate, E. - Aislamiento y estudio de nuevas cepas de *Pseudomonas lindneri* Kluyver et Hoppenbrouwers (*Termobacterium mobile* Lindner), en aguamieles de la meseta central mexicana. Ciencia (Mexico), 11:273-277, 1952.
4. Gonçalves de Lima, O.; Araújo, J.M. de; Schumacher, I.E. & Cavalcanti da Silva, E. - Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas pelo povo de Recife. I - Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* (Lindner) (1928) Kluyver & van Niel (1936); *Zymomonas mobilis* var. *recifensis* (Gonçalves de Lima, Araújo, Schumacher & Cavalcanti da Silva) (1970), isolada da bebida popular denominada "caldo de cana picado". Rev. Inst. Antibiót. (Recife), 10:3-15, 1970.
5. Scott, W.W. - Standard methods of chemical analysis. 5.ed. New York, D. van Nostrand, vol. 2, p. 2137, 1939.
6. Swings, J. & De Ley, J. - The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev., 41:1-46, 1977.

TEORES DE PROTEÍNAS E ÁCIDOS AMINADOS EM CÉLULAS DE CHLORELLA HOMOSPHEARA, CULTIVADAS EM DIFERENTES FONTES DE NITROGÊNIO

Selma Gomes Ferreira Leite
Francisca Pessôa de França (Bolsista CNPq)
& Carlos Augusto de Lima Oliveira

Deptº de Engenharia Bioquímica
Escola de Química UFRJ
Centro de Tecnologia - Bloco E
Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Estudo do teor de proteínas e ácidos aminados em células de *Chlorella homosphaera* cultivadas em três fontes nitrogenadas diferentes: uréia, nitrato de sódio e cloreto de amônio. Foi empregado meio de Simmer modificado, adicionado de 1% de glicose. Trabalhou-se com 2,2 litros de meio na temperatura de 35°C, aeração de 2,851/m³/l, agitação de 200rpm e iluminação contínua através de 4 lâmpadas fluorescentes de 40w cada. O teor proteico foi dosado pelo método de Kjeldahl e a análise das proteínas foi feita em analisador. O teor proteico em células de *Chlorella homosphaera* dependeu do composto nitrogenado. Uréia determinou os melhores valores de proteínas (40%). Os ácidos aminados detectados foram os mesmos nas três fontes testadas com pouca diferença quantitativa de uma fonte à outra. As concentrações desses ácidos aminados foram comparáveis às da FAO com exceção dos ácidos aminados sulfurados que foram mais baixos.

Summary

Protein and aminoacids content of Chlorella homosphaera in different nitrogen sources

The protein and amino acids content of *Chlorella homosphaera* was studied in three different nitrogen sources: urea, sodium nitrate and ammonium chloride. All tests were worked in 2.2. litres of Simmer's medium in mixotrophic condition, with controlled temperature (35°C), aeration (2.851/m³/l), agitation (200rpm) and continued illumination (4 fluorescent lamps of 40w each). The protein content was determined by the Kjeldahl method and the aminoacids analysed in an automatic analyser. The protein content in cells of *Chlorella homosphaera* was proportional to the nitrogen concentration and was dependent upon the nitrogen source. Urea gave the best contents (40%). No significant difference was noted among the amino acids synthesised and their contents in the three different sources tested. The amino acids concentrations were compatible with those of the FAO except for the sulphurated amino acids which were lower.

Introdução

Esfórcos estão sendo desenvolvidos no sentido de serem encontradas novas fontes de proteínas para suprir as necessidades alimentares.

Diversas possibilidades, com técnicas mais ou menos complexas, não se adequam a países menos favorecidos, monetariamente, havendo então necessidade de se recorrer às proteínas de microrganismos, particularmente de leveduras, algas, bactérias (8).

As algas microscópicas são promissoras, como fonte proteica (9), pois podem fixar CO₂ atmosférico e convertê-lo em carboidratos e, principalmente, em proteínas, quando cultivadas em adequada fonte de nitrogênio e condições de cultivo apropriados (8). As microalgas mais empregadas, nas pesquisas relacionadas à alimentação, pertencem aos gêneros *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina* (15). Células de *Chlorella* são consideradas como potencial fonte proteica, mas sabe-se que essas algas são deficientes em ácidos aminados sulfurados (9, 11, 18) o que pode ser corrigido por adição, por exemplo, de metionina (11, 18).

Valores em metionina, observados em células de *Chlorella* 71105 e superiores aos reportados em literatura (11), podem ser explicados pelas diferentes condições empregadas durante o processo de obtenção das proteínas (18).

De qualquer maneira, todos são categóricos ao afirmar que a quantidade de ácidos aminados essenciais da alga pode ser comparada aos ácidos aminados indicados pela FAO, em valores não muito inferiores aos das melhores fontes proteicas, como a do ovo e a caseína, e que a suplementação com metionina melhora, sensivelmente, os valores obtidos com a alga pura (9, 11, 18). Dos 21 ácidos aminados livres de *Chlorella pyrenoidosa*, 19 foram identificados: cisteína, lisina, histidina, asparagina, arginina, ácido asparagínico, serina, glicina, treonina, ácido glutâmico, α-alanina, prolina, tirosina, triptofano, ácido γ-aminobutírico, valina, fenilalanina, leucina e isoleucina. Células de culturas jovens contêm maior quantidade de ácidos aminados livres (13). A principal parte desses ácidos aminados livres consiste de ácido monoamino monocarboxílico e monoamino dicarboxílico e a taxa entre eles varia ligeiramente nos diversos períodos de crescimento da cultura (5, 13).

A amostra de *Chlorella homosphaera*, isolada do Lago da Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, quando cultivada em condição mixotrófica, apresenta rendimentos apreciáveis em biomassa, com altos teores proteicos. Sendo esta espécie pouco pesquisada, o trabalho teve por finalidade o estudo qualitativo e quantitativo de suas proteínas celulares.

Material e Métodos

Microrganismo - *Chlorella homosphaera* foi isolada do Lago da Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro e identificada no Departamento de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (2).

Meios de cultura - O meio base empregado foi o de Simmer modificado (17), com adição de 1% de glicose (6), variando-se a fonte nitrogenada original assim como suas concentrações. Portanto, trabalhou-se com meios diferentes, que constaram do meio base, contendo três diferentes fontes nitrogenadas: a) M₁ - meio contendo uréia, nas concentrações: 0,10, 0,20, 0,35, 0,70 e 1,00g l⁻¹; b) M₂ - meio contendo nitrito de sódio, nas concentrações: 0,58, 0,60, 0,98, 1,20, 1,97, 2,40, 2,82 e 10,00g l⁻¹ e c) M₃ - meio contendo cloreto de amônio, nas concentrações: 0,06, 0,12 e 0,24g l⁻¹. O pH inicial foi 7,0. Todos os meios foram esterilizados por autoclavagem a 110°C, por 20 minutos, com exceção da uréia, que foi esterilizada por filtração.

Inóculo - O inóculo foi obtido em frascos de 500ml, agitados (100-120

oscilações/min), contendo 100ml de meio, a 35°C, sob iluminação. O inóculo inicial foi de 0,25g l⁻¹ para as experiências com uréia e nitrito. Nas experiências com amônio, o inóculo foi de 0,01g l⁻¹, uma vez que o microrganismo não desenvolveu metabolismo mixotrófico em presença dessa fonte nitrogenada e, consequentemente, seu crescimento foi menor.

Condições de processo - Foram empregados fermentadores Virtis, contendo 2,2 litros de meio, em reatores com capacidade de 4 litros, com controle de agitação (200rpm), aeração (2,85l/m/l), temperatura (35°C) e iluminação através de quatro lâmpadas fluorescentes de 40w cada, colocadas a 30cm dos reatores. O tempo de cultura foi 50 horas.

Dosagem do teor proteico - A dosagem ocorreu ao final de cada batelada, nas células lavadas com água destilada, secas a 90°C e trituradas em gral. Foi empregado o método de Kjeldahl (1).

Análise das proteínas - A análise foi feita com células provenientes das experiências com 0,06g l⁻¹ de NH₄Cl, 0,35g l⁻¹ de uréia e 2,4g l⁻¹ de NaNO₃, colhidas na fase exponencial de crescimento. As células foram lavadas com metanol e água destilada, secas a 90°C, trituradas em gral, submetidas a hidrólise ácida e dosadas em analisador automático de aminoácidos Modelo 121 da Beckman.

Resultados e Discussão

Chlorella homosphaera foi capaz de desenvolver os metabolismos hetero, foto e mixotrófico, quando a fonte de nitrogênio usada foi nitrito de sódio ou uréia; com cloreto de amônio, utilizou-se apenas do metabolismo fototrófico. A concentração de uréia, que determinou o melhor teor proteico (40%), foi 0,70g l⁻¹, correspondente a 0,32g l⁻¹ de nitrogênio inicial; a concentração de nitrato de sódio foi 2,82g l⁻¹, correspondente a 0,46g l⁻¹ de nitrogênio, determinando 38% de proteína. O aumento do teor proteico, à medida que se aumentou a concentração de NaNO₃, também foi verificado por França & col. (7). Portanto, conclui-se que o teor de nitrogênio inicial, no meio de cultura, que proporcionou maior concentração de proteínas, nas células de *Chlorella homosphaera*, dependeu do composto nitrogenado (Fig. 1).

Miller & col. (12) obtiveram cerca de 40,6% de proteínas em células de *Chlorella sorokiniana*, cultivadas heterotroficamente, em presença de 1,5g l⁻¹ de uréia e 39,1% quando usaram 5,1g l⁻¹ de KNO₃.

Quando a fonte nitrogenada foi cloreto de amônio, o máximo teor proteico detectado foi maior que nas duas outras fontes testadas (Tabela 1). Segundo Dvoráková Hladká (3), as algas *Chlorella pyrenoidosa* e *Scenedesmus obliquus*, em condição heterotrófica, tendem a acumular altos teores de glicídios, levando menos nitrogênio à síntese proteica. De fato, todos os dados da literatura mostram teores de proteína maiores, em condição autotrófica.

Em condição mixotrófica, com amostra de *Chlorella vulgaris*, o íon amônio determina rápida formação de ácidos aminados (14).

O íon amônio também leva a altos níveis de ácidos aminados, em células de *Chlorella pyrenoidosa* (10). Apesar de melhor teor proteico, conseguido com cloreto de amônio, para produção de biomassa, o uso desse composto não seria vantajoso, pois o crescimento da microalga foi insignificante, quando comparado com as demais.

Dos 21 aminoácidos, 17 foram identificados nas células de *Chlorella homosphaera* (Tabela 2), empregando-se a hidrólise ácida, que des-trói o triptofano e transforma hidroxilisina, asparagina, hidroxipro-

lina e glutamina, nas formas ácidas respectivas: lisina, ácido aspártico, prolina e ácido glutâmico.

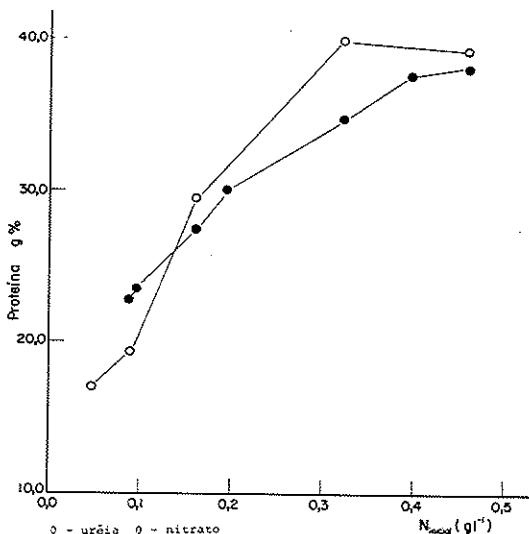
Tabela 1 - Influência da concentração de NH_4Cl no teor proteico das células de *Chlorella homosphaera*

NH_4Cl (gl ⁻¹)	Nitrogênio inicial (gl ⁻¹)	Proteína celular (g*)
0,06	0,015	$26,10^a \pm 0,30^b$
0,12	0,031	$55,33 \pm 0,32$
0,24	0,063	$40,56 \pm 0,37$

a. Média de quatro experimentos; b. Desvio padrão da média.

(4,9), o que foi aqui confirmado também para células de *Chlorella homosphaera*.

Figura 1 - Influência do nitrogênio inicial na produção de proteínas de células de *Chlorella homosphaera* em cultivo mixotrófico



A amostra apresentou os mesmos ácidos aminados, nas três fontes estudadas, com algumas diferenças quantitativas, de uma fonte a outra. Fowden (4), identificou os mesmos ácidos aminados em células de *Chlorella vulgaris*. Sâlăgeanu (16), encontrou ácidos aminados diferentes para diferentes fontes nitrogenadas em células de *Chlorella luteoviridis*. Entretanto, todos são categóricos ao afirmar que os teores em ácidos aminados sulfurados são baixos, quando comparados com os da FAO, para algas

Tabela 2 - Teores de ácidos aminados de células de *Chlorella homosphaera*, cultivadas em três fontes nitrogenadas

Ácidos aminados	Teores de ácidos aminados (g/100g de proteína)			
	<i>Chlorella homosphaera</i> NH_4Cl	NaNO_3	Uréia	FAO
lisina	4,1	8,2	3,3	4,2
histidina	5,3	1,1	5,8	-
arginina	1,2	tracos	0,6	-
ác. aspártico	8,0	9,5	7,5	-
treonina	3,6	4,5	3,5	2,8
serina	3,1	3,5	2,9	-
ác. glutâmico	10,6	11,3	9,5	-
prolina	3,6	4,7	3,2	-
glicina	4,7	6,0	5,8	-
alanina	7,1	8,5	6,7	-
cisteína	0,4	0,2	0,2	4,2
valina	4,8	6,1	4,6	4,2
metionina	1,3	1,8	1,3	2,2
isoleucina	4,3	4,8	3,7	4,2
leucina	8,5	10,5	8,1	4,8
tirosina	1,0	2,0	1,4	2,8
fenilalanina	3,7	5,0	3,6	2,8
tryptofano	-	-	-	1,4

Referências Bibliográficas

- AOAC - Official methods of analysis. 3.ed. Washington, Official Agricultural Chemists, 1965.
- Araújo, J.M. - Fonte de nitrogênio e teor de vitamina B₆ em *Chlorella homosphaera*. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia UFRJ, 1976. (Tese de Mestrado).
- Dvoráková Hladká, J. - A comparison of growth rate of algae as influenced by variation in nitrogen nutrition in *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. Biol. Plantarum (Praha), 13:1-11, 1971.

4. Fowden, L. - The composition of the bulk proteins of *Chlorella*. *Biochem. J.*, 50:355-358, 1951.
5. Fowden, L. - The effect of age on the bulk protein composition of *Chlorella vulgaris*. *Biochem. J.*, 52:310-313, 1952.
6. França, F.P. de & Maçaira, L.A. - Influência da concentração de glicose no crescimento de *Chlorella* sp. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 18:69-71, 1976.
7. França, F.P. & Yuan, M.C. - Influência da concentração de NaNO_3 na produção de biomassa de *Chlorella homosphaera*. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 9:88-91, 1978.
8. Grewell, E.H.M. - Utilization of vegetable proteins in human foods. *La Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 49:242-251, 1972.
9. Institut Français du Petrole - A new type of food algae. Ref. 14.237, A:1-9, 1967.
10. Kanazawa, T.; Kirk, M.R. & Bassham, J.A. - Regulatory effects of ammonia on carbon metabolism in photosynthesizing *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochem. Biophys. Acta*, 205:401-408, 1970.
11. Lubitz, J.A. - The protein quality, digestibility, and composition of algae, *Chlorella 71105*. *J. Food Science*, 28:229-232, 1963.
12. Miller, R.L.; Wickline, H.E. & Richardson, B. - Effects of heterotrophic and autotrophic growth conditions on the composition of *Chlorella sorokiniana*. *J. Food Science*, 36:774-777, 1971.
13. Mushak, P.O. & Semenyuk-Ivanyk, J.K. - Dynamics of free amino acids and amino acids composition of protein in *Chlorella pyrenoidosa* in relation to the physiological state of the cells. *Ukr. Bot. Zh.*, 28:294-298, 1971.
14. Reisner, G.S.; Gering, R.K. & Thompson, J.F. - The metabolism of nitrate and ammonia by *Chlorella*. *Plant Physiol.*, 35:48-52, 1960.
15. Rosenberg, J.A. - O potencial das algas: possibilidades de *Scenedesmus quadricauda* isolada no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Escola de Química UFRJ, 1976. (Tese de Mestrado).
16. Sălăgeanu, V.R. - Influence of different nitrogen sources on some physiological processes in the alga *Chlorella luteoviridis Chodat*. *Rev. Roum. Biol. Botanique*, 17:283-289, 1972.
17. Silva Filho, M.V. - Influência da relação carbono/nitrogênio (C/N) no crescimento heterotrófico de uma amostra de *Scenedesmus intermedius Chod.* Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia UFRJ, 1979. (Tese de Mestrado).
18. Yamaguchi, M.; Hwang, H.G.; Kawaguchi, K. & Kandatsu, M. - Metabolism of ^{15}N labelled *Chlorella* protein in growing rats with special regard to the nutritive value. *Br. J. Nutr.*, 30:411-424, 1973.

INDUCTION OF PROPHAGE BY 8-METHOXYPSORALEN PLUS NEAR UV LIGHT IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

José Pinto de Siqueira Júnior

Deptº de Biologia CCEN
Universidade Federal da Paraíba
Campus Universitário
58000 João Pessoa PB, Brasil

& João Lúcio de Azevedo

Laboratório de Genética ANI-IB
Universidade de Brasília
Campus Universitário
70910 Brasília DF, Brasil

Summary

Evaluation of the action of 8-methoxypsonoralein plus near UV light (~365nm) - 8MOP-NUV - on the induction of prophages in *Staphylococcus aureus* 609tet-r. The prophage induction frequencies after NUV irradiation in the presence of 8MOP showed a typical dosis-effect curve also known for other lysogenic systems. In the experimental conditions the maximum frequency of induction was greater than that obtained after far ultraviolet light irradiation (~245nm).

Resumo

Indução de prófagos pela 8-methoxipsoraleina associada à luz ultravioleta longa em *Staphylococcus aureus*

Avaliação de 8-methoxipsoraleina associada à luz ultravioleta longa (~365nm) - 8MOP-UVL na indução de prófagos em *Staphylococcus aureus* 609tet-r. As frequências de indução de prófagos por UVL, na presença de 8MOP, quando lançadas em gráfico, em função da dose, revelaram uma curva de dose-efeito típica, também conhecida para outros sistemas lisogênicos. Para as condições experimentais utilizadas, a frequência máxima de indução foi maior que aquela obtida após irradiação por luz ultravioleta curta (~245nm).

Introduction

Lysogeny is virtually universal in *Staphylococcus aureus*. Prophages are presumed to be integrated into the chromosomes, although linkage to established chromosomal genes has been shown only in a few cases as for instance, by Patte & col. (13). *S. aureus* prophages can be induced by far UV light (8), mitomycin C (10) and nalidixic acid (5).

The use of more than one induction technique is recommended for the detection of lysogeny in *S. epidermidis* (14) and possibly also in *S. aureus*. Thus, the investigation of new inducing agents is needed.

In the presence of near UV light (~365nm), 8-methoxypsonoralein 8MOP and other furocoumarins produce lethal and mutagenic effects in a wide variety of biological systems (1, 15) and induce prophage in *Escherichia coli* (2) and *Haemophylus influenzae* (4). The objective of

the present work was to evaluate the action of 8-methoxypsoralen plus near UV light on induction of prophage in *Staphylococcus aureus*.

Material and Methods

Bacterial strains and growth medium - Strain 609-tet-r (10) was used for prophage induction of PS83A as indicator. Both strains were grown in Brain Heart Infusion (BHI, Difco 37g/l).

Treatment with 8-methoxypsoralen plus near UV light (8MOP-NUV) - An 8MOP (Sigma) solution was prepared with acetone and saline (12). An 18-24 hours culture in BHI was centrifuged and resuspended in saline ($\sim 10^8$ cells/ml), containing 25 μ g/ml of 8MOP. After at least 30 minutes in the dark at room temperature, 3.0ml portions were irradiated for different periods of time in an open Petri dish, 5.0cm in diameter, at a distance of 1.0cm from the light source (Mineralight UV Lamp, model UVSL 25, 4W set for near UV light-mainly 365nm) with gentle shaking in a darkened environment. Portions of 8MOP-free suspension were also irradiated for comparison.

Treatment with far UV light (FUV) - An 18-24 hour culture in BHI was centrifuged and resuspended in saline ($\sim 10^8$ cells/ml) and 3.0ml portions were irradiated for different periods of time in an open Petri dish, 5.0cm in diameter, at a distance of 7.0cm from the light source (Mineralight UV Lamp, model UVSL 25, 4W set for far UV light - mainly 245nm) with gentle shaking in a darkened environment.

Determination of prophage induction - Portions (0.1ml) of diluted suspension of the treated bacteria were mixed with 0.1ml of an overnight culture of the indicator strain, in 2.5ml of a top agar medium (Blood Agar Base, Difco 20g/l) at 45°C, and overlaid on hard agar medium (Blood Agar Base, Difco 40g/l). After overnight incubation at 30°C, infective centers were counted. Portions (0.1ml) of diluted suspension of the treated bacteria were also overlaid without indicator strain, and colonies were counted after overnight incubation at 30°C. Thus, phage titer and bacterial titer were calculated.

Results and Discussion

Survival (bacterial titer at time $t \times 100$ /bacterial titer at time 0) and induction frequency (phage titer at time $t \times 100$ /bacterial titer at time 0) were calculated for each NUV irradiation time in the presence and absence of 8MOP (Table 1 and Figure 1).

Table 1 - Induction of prophages in strain 609tet-r of *Staphylococcus aureus* after FUV irradiation

Irradiation time (sec.)	Frequency of induction (%)*	
	with 8MOP	without 8MOP
0	0.084 (100)**	0.039 (100)**
20	0.72 (70)	0.032 (82)
40	10.0 (11)	0.10 (85)
60	2.6 (0.28)	0.13 (90)
80	0.19 (0.0012)	0.11 (82)

* Means of at least three experiments

** Survival (%) is given in parenthesis.

Prophage induction by FUV was determined for comparison (Table 2 and Figure 1).

Table 2 - Induction of prophages in strain 609tet-r of *Staphylococcus aureus* after FUV irradiation

Irradiation time (sec.)	Frequencies (%)*	
	survival	induction
0	100.0	0.19
5	68.0	2.6
10	36.0	4.5
20	6.3	4.7
30	1.1	3.6

* Means of at least three experiments.

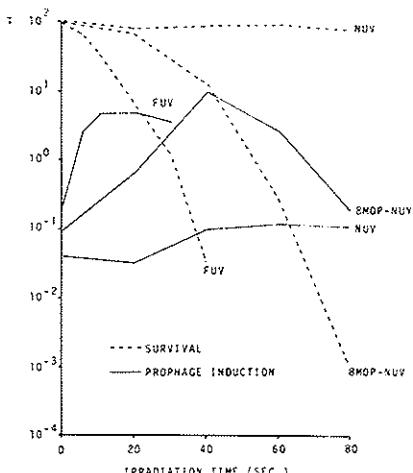
exponentially.

Maximum frequency of induction in the present study was 10% for 11% survival.

In the absence of 8MOP, NUV was much less efficient in prophage induction, at least at the doses used. At the concentration used, 8MOP alone seemed to have no effect on induction, but other 8MOP concentrations should be tested for more definite conclusions.

At higher survival rates (>36%), treatment with NUV was more effective than 8MOP-NUV in prophage induction (Fig. 1). When maximum induction frequency is considered, however, the opposite situation is observed.

Figure 1 - Survival and induction of prophages in strain 609tet-r of *Staphylococcus aureus* after NUV irradiation in the presence and absence of 8MOP, and after NUV irradiation



When the frequency of prophage induction after NUV irradiation in the presence of 8MOP was plotted graphically, a typical dosis-effect curve was obtained, similar to the well known curve obtained for other lysogenic systems, under the action of physical and chemical agents (7, 9). Thus, from an initial frequency value reflecting the number of free phages in the suspension, the frequency of bacteria that are induced to release phages increases with dose, reaches a maximum that varies according to the lysogenic system under study and finally decreases exponentially.

Maximum frequency of induction in the present study was 10% for 11% survival.

Curves similar to those obtained in the present work were obtained by Fujita & col. (2) after 8MOP-NUV treatment of *E. coli* (lambda), with 27% maximum induction frequency of 27% at 60% survival. Fujita & Suzuki (3), when testing different wavelengths between 298 and 380nm, found that wavelengths between 320 and 345nm were the most efficient for prophage induction, with maximum induction frequency of 10-20%.

Prophages of *H. influenzae* can be induced by psoralen-NUV in wild type strain, in excision repair-deficient strains (*uvrl* and *uvr2*), but not in a recombination-deficient strain (*rec1*); however, recombinational events per se may not be involved in prophage induction in *H. influenzae* since induction occurs normally in the *rec2* strain (4). Similar studies could be carried out in *S. aureus* due to the availability of *rec* strains (16), of methods for isolating

tion of *uvr* strains (6) and considering the relative ease of construction of lysogenic strains (11). The use of such strains may be important for the elucidation of the mechanism of action of furocoumarins-NUV not only in prophage induction but also in other biological effects.

Acknowledgement

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/PIG).

References

1. Ashwood-Smith, M.J. & Grant, E. - Conversion of psoralen DNA monooadducts in *E. coli* to interstrand DNA cross links by near UV light (320-360nm): inability of angelicin to form cross links, "in vivo". *Experientia*, 33:384-386, 1977.
2. Fujita, H.; Sano, M. & Suzuki, K. - Effect of near ultraviolet light on *Escherichia coli* sensitized with 8-methoxysoralen: mutagenic effect and induction of lambda prophage. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, 3:35-42, 1978.
3. Fujita, H. & Suzuki, K. - Effect of near UV light on *Escherichia coli* in the presence of 8-methoxysoralen: wavelenght dependency of killing, induction of prophage, and mutation. *J. Bacteriol.*, 135:354-362, 1978.
4. George, M. & Notani, N.K. - Genetic control of prophage induction in *Haemophilus influenzae* after exposure to psoralen plus near-UV light. *J. Virol.*, 35:965-967, 1980.
5. German, A.; Panouse-Perrin, J. & Ardovin, A.C. - Étude comparative de l'action de la mitomycine C et de celle de l'acide nalidixique sur des staphylocoques normaux et lysogènes. *Ann. Pharm. Fr.*, 29:93-106, 1971.
6. Goering, R.V. - Mutants of *Staphylococcus aureus* deficient in recombinational repair. *Mutat. Res.*, 60:279-289, 1979.
7. Jacob, F. & Wollman, E.L. - Lysogeny. In: - Burnet, F.M. & Stanley, W.M., eds. - *The viruses*. London, Academic Press, p. 319-351, 1959.
8. Karska, B.; Kozak, W.; Narbutowicz, B. & Stolarska, A. - The lysogenicity of staphylococci in isolated in Poland. *J. Gen. Microbiol.*, 23:577-581, 1960.
9. Kondo, S.; Ichikawa, H.; Iwo, K. & Kato, T. - Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of *Escherichia coli* with different RNA repair capacities. *Genetics*, 66:187-217, 1970.
10. Lacey, R.W. - Transfer of tetracycline-resistance between strains of *Staphylococcus aureus* in mixed cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 69:229-237, 1971.
11. Lacey, R.W. - Evidence for two mechanisms of plasmid transfer in mixed cultures of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 119:423-435, 1980.
12. Oginsky, E.L.; Green, G.S.; Griffith, D.G. & Fowlks, W.L. - Lethal photosensitization of bacteria with 8-methoxysoralen to long wave lenght ultraviolet radiation. *J. Bacteriol.*, 78:821-833, 1959.

13. Patte, P.A.; Thompson, N.E.; Haubrich, D. & Novick, R.P. - Chromosomal map locations of integrated plasmids and related elements in *Staphylococcus aureus*. *Plasmid*, 1:38-51, 1977.
14. Pulverer, G.; Pillich, J.; Klein, A. & Krivankova, M. - Studies on lysogeny of *Staphylococcus albus*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 159:115-119, 1974.
15. Scott, B.R.; Pathak, M.A. & Mohn, G.R. - Molecular and genetic basis on furocoumarin reactions. *Mutat. Res.*, 39:29-74, 1976.
16. Wyman, L.; Goering, R.V. & Novick, R.P. - Genetic control of chromosomal and plasmid recombination in *Staphylococcus aureus*. *Genetics*, 76:681-702, 1974.

ATIVIDADE ANTIVIRÓTICA DO LAPACHOL*

Maria Helena do Carmo Lagrota
 Márcia Dutra Wigg
 Luiz Octávio Barroso Pereira
 Maria Evangelina Ferreira Fonseca
 Nuno Álvarez Pereira
 & João Ciribelli Guimarães

Deptº de Virologia
 Instituto de Microbiologia UFRJ
 Caixa Postal 68040
 21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

O lapachol (2-hidróxido-3-(3-metil-2-butenil)1,4-naftoquinona) é uma substância obtida do extrato de cerne de plantas, principalmente do gênero *Tecoma* (família *Bignoniaceae*) e é conhecido por suas propriedades anti-cancerígenas. Com esta substância, fizemos um estudo para verificar sua atividade antivirótica em cultura de células e em ovos embrionados, frente ao adenovírus tipo 5, herpes simplex tipo 1, vírus da encefalomielite equina do oeste, vírus da estomatite vesicular sorotipo Brasil (Alagoas), poliovírus tipo 1, echovírus tipo 19, coxsackievírus B₄ e frente a várias cepas de vírus influenza (A/PR/8/34, A₂/England/42/72, A₂/Brasil/78 e A/Port Chalmers/1/73). O lapachol mostrou ter atividade antivirótica, com índice de inibição virótico significativo para o poliovírus e o vírus da estomatite vesicular e excelente percentagem de inibição dos títulos hemaglutinantes para todas as cepas de vírus influenza estudadas.

Summary

Antiviral activity of lapachol

Lapachol (2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)1,4-naphthoquinone) is a substance obtained from extracts of plant cores, specially of the *Tecoma* genus (family *Bignoniaceae*). It is known as a potent anti-tumor substance. It was tested for its antiviral properties in tissue culture and embryonated eggs, against adenovirus type 5, herpes simplex type 1, western equine encephalomyelitis virus, vesicular stomatitis virus Brasil type (Alagoas), poliovirus type 1, echovirus type 19, coxsackievirus B₄ and influenza virus (A/PR/8/34, A₂/England/42/72, A₂/Brasil/78 and A/Port Chalmers/1/73). We have observed that lapachol has an antiviral activity, with a significant viral inhibition index in relation to poliovirus and vesicular stomatitis virus and that it significantly inhibited the hemagglutinating titres of all influenza virus strains tested.

Introdução

Na década de 1960, no Brasil, houve grande divulgação das proprie-

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia UFRJ, com recursos do CEPG (Conselho de Ensino para Graduados, UFRJ), CNPq e FINEP.

dades anti-cancerígenas, atribuídas ao ipê-roxo, nome popular dado às espécies pertencentes à bignoniáceas. Verificou-se, mais tarde, no cerne dos ipês, principalmente no do gênero *Tecoma*, a existência de uma substância, denominada lapachol (2-hidróxido-3-(3-metil-2-butenil)1,4-naftoquinona), cujo peso molecular é 242,26 (20). Quando purificada esta substância apresenta-se, no estado sólido, em cristais prismáticos, amarelados, de ponto de fusão 140°C, sendo bastante solúveis em soluções alcalinas, com a formação do lapacholato correspondente (6).

O lapachol revelou uma série de propriedades farmacológicas, principalmente, a de um efeito inibidor sobre o crescimento de tumores malignos (10, 11, 14, 16, 17).

A capacidade anti-cancerígena incentivou a execução deste trabalho, com o objetivo de verificar se o lapachol também apresentava atividade antivirótica. Com esta finalidade, a substância foi testada, em cultura de células e em ovos embrionados, frente a ribovírus e desoxirribovírus.

Material e Métodos

Substância estudada - O lapachol foi fornecido pelo Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da UFRJ, purificado em forma de cristais. A substância foi solubilizada em meio alcalino e ressuspensa em meio de manutenção de cultura de células (meio mínimo essencial de Eagle sem soro).

Vírus empregados - Adenovírus tipo 5 (Ad₅), procedente do World Influenza Centre, Mill Hill, London, England; herpes simplex tipo 1 (HSV₁), isolado no Departamento de Virologia (DV) do Instituto de Microbiologia (IM) da UFRJ; vírus da estomatite vesicular sorotipo Brasil - Alagoas (VSA), isolado em Alagoas (1); vírus da encefalomielite equina do oeste (WEE); policívirus tipo 1 (P₁S); coxsackievírus do grupo B tipo 4 (cox. B₄) e echovírus tipo 19 (Echo 19), do National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Maryland, USA; vírus influenza: A/PR/8/34 (H₀N₁) e A₂/England/42/72 (H₃N₂), procedentes também do World Influenza Centre, Mill Hill, London, England; A₂/Brazil/78 (H₃N₂), fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz, RJ e A/Port Chalmers/1/73 (H₃N₂), isolado no DV do IM da UFRJ.

Linhagens de células - Para a preparação das suspensões dos vírus e para os testes de atividade antivirótica, as seguintes linhagens de células foram usadas: HeLa para Ad₅ e HSV₁; LLC-MK₂ para VSA, P₁S, Cox. B₄ e Echo 19; e Vero para WEE.

As linhagens de células foram tripsinizadas (18) e ressuspensas em meio mínimo essencial de Eagle, suplementado com 10% de soro bovino, 100µg/ml de estreptomicina, 25mg/ml de fungizona e 100UI/ml de penicilina. As células foram cultivadas em microplacas descartáveis (4).

Ovos embrionados - Ovos embrionados, com 9 a 11 dias de incubação, foram utilizados para a multiplicação das cepas de vírus influenza e para as experiências de atividade antivirótica.

Determinação da citotoxicidade - A concentração máxima, não tóxica do lapachol, para cultura de células, foi determinada por um método similar ao descrito por Walker & col. (22). Para isto, várias concentrações da droga foram colocadas em contato com a monocamada de células e o efeito tóxico visualizado por meio de microscópio invertido, após cinco dias de incubação a 37°C.

Toxicidade do lapachol para os embriões - Este teste foi realizado,

inoculando-se diferentes concentrações da substância, em ovos embrionados via alantóica (1ml/ovo), e estes incubados a 37°C em condições adequadas de umidade (56 a 60%). Diariamente, os ovos foram examinados para averiguação da sensibilidade do embrião à droga, até um prazo máximo de cinco dias.

Determinação da atividade antivirótica em cultura de células - A atividade do lapachol foi avaliada pela determinação do índice de inibição virótico (IIV), segundo o método recomendado por Grumberg & Prince (7) e Sidwell & col. (19) e modificado por Lagrota (9). O método consistiu em titular os vírus em cultura de células com ou sem lapachol. Os títulos foram avaliados pelo método estatístico de Reed & Muench (15) e o IIV obtido pela fórmula:

$$\text{IIV} = \frac{\text{Título do vírus em cultura de células sem substância}}{\text{Título do vírus em cultura de células com diferentes concentrações da substância}}$$

O IIV foi dado em log do TCD₅₀ (dose que infecta 50% de cultura de células inoculadas) e foi considerado significativo quando era igual ou maior a 1,7 log (9).

Determinação da atividade antivirótica em ovos embrionados - A avaliação da atividade do lapachol, frente aos vírus influenza, foi feita pela redução do título hemaglutinante, a partir do líquido alantóico de ovos tratados e não tratados. Com esta finalidade, diferentes concentrações da droga foram inoculadas, por via alantóica, nos ovos embrionados (oito ovos por concentração), na mesma quantidade usada no teste de toxicidade. Após duas horas/37°C, os ovos foram inoculados pela mesma via, com as diferentes amostras de influenza (0,1ml/ovo). Após incubação a 37°C/48 horas, os líquidos alantóicos foram retirados e reunidos em um único "pool", para serem titulados por reação de hemaglutinação.

Hemaglutinação (HA) - Os líquidos alantóicos de ovos tratados e não tratados com o lapachol, foram diluídos ao dobro em solução salina 0,85%, diretamente em placas de lucite. Sobre estas diluições, adicionou-se parte igual de hemácia de ganso a 0,5% na mesma solução salina. A leitura foi feita após uma hora a 4°C e a porcentagem de redução do título foi calculada pela seguinte fórmula (13):

$$\% \text{ de inibição da multiplicação viral} = \frac{\text{título HA do grupo tratado}}{\text{título HA do grupo controle}} \times 100$$

Foi realizada também reação de hemaglutinação com várias concentrações do lapachol com a finalidade de verificar se esta substância apresentava capacidade de aglutinar hemácias.

Resultados e Discussão

Antes da avaliação da atividade antivirótica do lapachol, foi determinada a concentração máxima não tóxica (CMNT), para as células cultivadas "in vitro" e para os embriões de galinha. Em relação à cultura de células, a CMNT foi de 10µg/ml para HeLa e LLC-MK₂ e de 5µg/ml para Vero. Para os ovos embrionados, foi de 1000µg/ml. Foram empregadas as concentrações de 1,2; 2,5; 5,0 e 10,0µg/ml, para os estudos em cultura de células e 62; 125; 250; 500 e 1000µg/ml, para os estudos em ovos embrionados.

Os resultados da titulação dos vírus em cultura de células com e sem lapachol nas diferentes concentrações, estão expressos em IIV (Tabela 1). O lapachol foi eficaz, quando o IIV era igual ou maior do que 1,7 log (9).

Tabela 1 - Índices de inibição viral do lapachol para os vírus inoculados em culturas de células HeLa (Ad₅, HSV), LLC-MK₂ (P₁S, Cox. B₄, Echo 19, VSA) e Vero (WEE)

Vírus	Concentração do lapachol ($\mu\text{g/ml}$)				Título dos vírus controle (TCD ₅₀)
	1,2	2,5	5,0	10,0*	
Adeno tipo 5 (Ad ₅)	1,1**	1,6	1,4	1,6	5,8
Herpes simplex tipo 1 (HSV)	0,2	0,0	0,1	1,2	6,0
Pólio tipo 1 (P ₁ S)	0,8	1,2	3,6	2,9	6,3
Coxsackie B ₄ (Cox. B ₄)	0,0	0,0	0,0	0,0	5,0
Echo tipo 19 (Echo 19)	0,1	0,2	0,2	1,0	4,8
Estomatite Vesicular Alagoas (VSA)	0,3	1,3	2,3	3,1	6,1
Encefalomielite Eqüina do Oeste (WEE)	0,7	0,8	1,0	-***	7,0

* Concentração máxima não tóxica para cultura de células; ** Expressão log do TCD₅₀; *** Concentração tóxica para célula Vero.

Levando-se em conta este padrão, o lapachol apresentou atividade para os vírus P₁S e VSA, nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$. Para os demais vírus, houve redução dos títulos, porém o IIIV não alcançou o índice significativo.

Os resultados da atividade do lapachol, frente aos vírus influenza, inoculados em ovos embrionados, estão expressos em títulos hemaglutinantes dos vírus e em percentagens de redução destes títulos (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade antivirótica do lapachol frente aos vírus influenza

Concentração da droga ($\mu\text{g/ml}$)	Títulos hemaglutinantes (T) e percentagens (%) de redução dos títulos dos vírus				A/PR/8/34	
	A/Port Chalmers/1/73		A ₂ /England/42/72			
	T	%	T	%		
62	20*	97	<5	>99	5	99
125	20	97	<5	>99	<5	>99
250	10	99	<5	>99	<5	>99
500	20	97	<5	>99	<5	>99
1000	10	99	<5	>99	<5	>99
Título do controle.	640	-	640	-	1280	-
					1280	-

* Inverso do título hemaglutinante.

A reação de hemaglutinação, realizada com diferentes concentrações do lapachol, demonstrou que esta substância não possui capacidade de aglutinar hemácias, não influenciando, portanto, nos resultados obtidos com o vírus em estudo.

Uma substância é eficaz quando a percentagem de redução do título hemaglutinante é maior do que 90% (13). Segundo este critério, o lapachol, em todas as concentrações empregadas, reduziu significativamente os títulos das várias amostras de vírus influenza estudadas.

Em camundongos, o lapachol é ativo contra dois tipos de tumores sólidos, o carcinossarcoma de Walker-256 e o linfossarcoma Murphy-Sturm (10,11). Devido à atividade, altamente expressiva sobre o carcinossarcoma de Walker-256 e aos sinais relativamente brandos de toxicidade geral, o lapachol foi aprovado pelo "Cancer Chemotherapy National Service Center" para triagem no homem (14).

Assim, além de suas propriedades anticancerígenas (10, 11, 14, 16, 17) certificamos que esta substância também apresenta atividade anti-

virótica para vírus RNA (P₁S, VSA e influenza).

Para o vírus P₁S, o lapachol apresentou alto IIV (3,6 e 2,9) nas concentrações de 5 e 10 μ g/ml respectivamente. O mesmo efeito significativo foi notado em relação ao VSA, cujos IIV foram de 2,3 e 3,1 nas respectivas concentrações, 5 e 10 μ g/ml.

Para o vírus Ad₅ (DNA sem envelope), embora não tenha havido um resultado eficaz, o IIV ficou muito próximo do significante na concentração máxima empregada. Se fosse possível aumentar esta concentração, nas experiências, os resultados poderiam ser mais satisfatórios, vez que tivemos que levar em consideração sua toxicidade frente às culturas de células empregadas.

O mesmo problema não foi encontrado com os ovos embrionados, onde foi possível usar concentração mais elevada da substância. Neste hospedeiro, o lapachol reduziu, significativamente, os títulos hemaglutinantes dos vírus influenza, em todas as concentrações empregadas.

Neste trabalho, o lapachol mostrou atividade antivirótica somente para vírus RNA. Com relação ao envoltório da partícula viral, não foi notada qualquer influência sobre a atividade da substância. O lapachol demonstrou reação inibitória, tanto para vírus envelopados (VSA e influenza), quanto para vírus sem esta estrutura (P₁S).

Apesar de algumas substâncias naturais apresentarem, experimentalmente, eficácia sobre determinados vírus (3, 8, 21), nenhuma ainda foi comercializada com tal indicação. No entanto, substâncias de síntese química têm mostrado expressiva atividade antivirótica. A amantadina, iododesoxiuridina e metisazona com atividade, respectivamente, para os vírus influenza (5), herpes simplex (12) e varíola (2) chegaram a ser comercializadas.

Desde que o lapachol já foi liberado para estudo no homem, para tratamento de câncer (14) e devido aos resultados satisfatórios, obtidos "in vitro", frente aos vírus RNA, esta pesquisa merece ter prosseguimento, com estudo sobre sua atividade antivirótica em animais de laboratório. Por esse motivo, atualmente, além de dar continuidade aos estudos com o lapachol, estamos analisando 42 de seus derivados sintéticos frente a vários vírus.

Referências Bibliográficas

1. Andrade, C.M.; Rosas, C.E.E.; Amorim, L.M.; Mota, J.P.; Teixeira, E.N. & Santos, N.F. - Estomatite vesicular no Brasil. I - Isolamento do vírus Alagoas. VII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto Alegre, RS, 1976.
2. Bauer, D.J.; Vincent, L.S.; Kemper, C.H. & Downie, A.W. - Prophylactic treatment of smallpox contacts with N-methylation beta-thiosemicarbazone. Lancet, 2:494-496, 1963.
3. Béládi, I.; Puszta, R.; Mucsi, I.; Bakay, M. & Gábor, M. - Activity of some flavonoides against viruses. Ann. N.Y. Acad. Sci., 284:358-364, 1977.
4. Brito, M.A.V.P.; Lagrota, M.H.C. & Machado, R.D. - Emprego de micro-técnica na triagem de substâncias antivirais. Rev. Microbiol., 12:65-69, 1981.
5. Davies, W.L.; Grunert, R.R.; Haff, R.T.; McGahen, J.W.; Neumayer, E.M.; Paulshock, M.; Watts, J.C.; Wood, T.R.; Herrmann, E.C. & Hoffmann, C.E. - Antiviral activity of l-adamantanamine (amantadine). Science, 144:862-863, 1964.

6. Ferreira, L.G. - Lapachol: processo extractivo. Rev. Bras. Farm., (set/dez):153-156, 1975.
7. Grumberg, E. & Prince, H.N. - The antiviral activity of 3,4-dihydro-1-isoquinolineacetamide hydrochloride "in vitro", "in ovo" and in small laboratory animals. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 219:422-430, 1968.
8. Horwitz, M.S. & Brayton, C. - Camptothecin: mechanism of inhibition of adenovirus formation. Virology, 48:609-698, 1972.
9. Lagrota, M.H.C. - Atividade antiviral "in vitro" de substâncias sintéticas e naturais. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978. (Tese de Mestrado).
10. Lima, O.G.; Coelho, J.S.B.; d'Albuquerque, I.L.; Mello, J.F.; Martins, D.G.; Lacerda, A.L. & Souza, M.A.M. - Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. Rev. Inst. Antib. (Recife), 11:21-26, 1971.
11. Linardi, M.C.F.; Oliveira, M.M. & Sampaio, M.R.P. - A lapachol derivative active against mouse lymphocytic leukemia P-388. J. Med. Chem., 18:1159-1161, 1975.
12. Maxwell, E. - Treatment of herpes keratitis with 5-iodo-2'-deoxyuridine (IDU). Amer. J. Ophthal., 36:571-573, 1963.
13. Nishimura, T.; Toku, H. & Fukuyasu, H. - Antiviral compounds. XII - Antiviral activity of amidonohydrazones of alkoxyphenil substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and in mice. Kitasato Arch. Exp. Med., 50:39-46, 1977.
14. Rao, K.V.; McBride, T.J. & Oleson, J.J. - Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. Cancer Res., 28:1952-1954, 1968.
15. Reed, L.J. & Muench, H. - A simple method of estimating fifty percent endpoints. Amer. J. Hyg., 27:493-497, 1938.
16. Rizzini, C.T. & Mors, W.R. - Botânica econômica brasileira. São Paulo, Edusp, p. 71-78, 1976.
17. Santana, C.F.; Lima, O.G.; d'Albuquerque, I.L.; Lacerda, A.L. & Martins, D.G. - Observações sobre as propriedades antitumorais e toxicológicas do extrato do liber e de alguns componentes do cerne do pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). Rev. Inst. Antib. (Recife), 8:89-93, 1968.
18. Schmidt, N.J. - Tissue culture methods for diagnostic virology. In: - Lennette, E.H. & Schmidt, N.J., eds. - Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. 4.ed. New York, American Public Health Association, p. 78-170, 1969.
19. Sidwell, R.W.; Arnett, G.; Dixon, G.J. & Schabel, F.M. - Purine analogs as potential anticytomegalovirus agents. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 131:1223-1230, 1969.
20. The Merck Index - An encyclopedia of chemicals and drugs. 9.ed. New York, Merck, 1976.
21. Ussery, M.A.; Irvin, J.D. & Hardesty, B. - Inhibition of poliovirus replication by plant antiviral peptide. Ann. N.Y. Acad. Sci., 284:431-440, 1977.
22. Walker, W.E.; Waishren, B.A.; Martins, R.R. & Batayras, G.E. - A method for determining sensitivities of antiviral drugs "in vitro" for possible use as clinical consultation. Amer. J. Clin. Path., 56:687-692, 1971.

PRODUÇÃO DA VACINA ANTI-RÁBICA VETERINÁRIA EM SUSPENSÃO DE CÉLULAS BHK

Rosalvo Guidolin

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

Mário Castro Baltazar

Deptº de Desenvolvimento de Vacina
Pfizer Química Ltda.
Caixa Postal 3896
07000 Guarulhos SP, Brasil

& Flávio Zelante

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP

Resumo

Em tanque de 150 litros de capacidade, contendo 100 litros de células BHK-21 cultivadas em suspensão, estas foram inoculadas com a amostra PV de vírus fixo da raiva, para produção de vacina. Uma concentração relativamente elevada de vírus foi obtida após 96 a 120 horas de cultivo, que permitiu a preparação de vacina para imunização de cães e bovinos contra a raiva. Os testes laboratoriais de potência pelos métodos do NIH, Habel e Koprowski foram plenamente satisfatórios. A vacina preparada para a imunização de bovinos, adicionada de hidróxido de alumínio, protegeu os 10 animais vacinados contra o desafio pela inoculação de 4×10^8 LD₅₀ (camundongo) de vírus rábico isolado de morcego. São ainda apresentadas observações sobre a evolução dos cultivos celulares e dinâmica de replicação viral nas suspensões celulares usadas. Algumas das experiências realizadas sugerem a possibilidade de preparação de uma vacina não inativada com a amostra PV.

Summary

Veterinary antirabic vaccine production in BHK cells suspension

A 150 liters capacity tank, containing 100 liters of the BHK-21 cells cultivated in suspension was inoculated with fixed rabies virus, PV sample, for vaccine production. A relative high virus concentration was obtained after 96 to 120 hours of cultivation, which enabled the preparation of vaccine for dogs and bovines immunization against rabies. Potency tests by NIH, Habel and Koprowski methods were entirely satisfactory. The vaccine prepared for bovine immunization, added of a aluminum hydroxyde, protected the ten animals vaccinated against the challenge by inoculation of 4×10^8 LD₅₀ (mouse) of rabies virus isolated from bat. Other considerations are presented regarding the evolution of cellular cultures and viral dynamics replication in it. Some of the trials carried out suggested feasibilities of preparing a non inactivated vaccine with the PV sample.

Introdução

As primeiras vacinas anti-rábicas inativadas, obtidas em tecido nervoso de diferentes espécies animais apresentavam, quando de seu emprego, elevados riscos de reações secundárias. A adoção da técnica do ovo embrionado, embora atenuando o problema apresentava, ainda, algumas desvantagens, principalmente devido ao produto vacinante incorporar elevados teores de proteínas, fator restritivo de seu emprego.

Tendo Kissling (8) demonstrado a possibilidade de preparação do vírus rábico em sistemas celulares de origem não nervosa, utilizando cultura de células de rim de hamsters em monocamada, foi possível a obtenção de um produto final satisfatório. Todavia, era necessário equipamento volumoso e número relativamente grande de técnicos adequadamente treinados para a obtenção de quantidades substanciais de vacina.

Atanasiu (2) e Chapman (3) demonstraram, em escala laboratorial, a viabilidade do emprego de células BHK mantidas em suspensão, como substrato para a replicação do vírus rábico.

Larghi (10) preparou excelente vacina de uso veterinário com a propagação da cepa PV de vírus rábico em monocamada de células BHK-21 clone 13.

Baseados no exposto, os autores procuraram adaptar o vírus rábico, cepa PV, a cultura de células BHK-21 clone 13 desenvolvidas e mantidas em suspensão, objetivando obter um produto vacinante em escala industrial e isento, o máximo possível, de fatores responsáveis por efeitos colaterais.

Material e Métodos

1. *Cultura de células* - Para o desenvolvimento inicial, células BHK-21 clone 13 conservadas em nitrogênio líquido, foram semeadas no meio de Padua-Pirbright de crescimento (PPC) (13), enriquecido com 10% de soro estéril de bovinos. Após 48 horas de cultivo a 36-37°C, em tanques de 150 litros de capacidade com 100 litros de meio e sob agitação magnética constante de 250 a 300rpm, foi obtida a concentração de 2×10^6 células por ml. O pH do cultivo, freqüentemente ajustado, foi mantido entre 7,2 a 7,4, pela adição de solução de glicina a 15%. Após a sedimentação celular, durante o período de 12 horas a 4°C, o sobrenadante foi esgotado e substituído pelo meio Padua-Pribright de manutenção (PPM) (13), com a mesma fórmula anterior, porém não adicionado de soro bovino.

2. *Vírus* - Foi utilizado o vírus rábico fixo PV-BHK-4, nº 3261*, título infectante $1,5 \times 10^{-8}$ PUF/ml adaptado a monocamada de células BHK-21. Após sete passagens nessas células a suspensão viral cultivada por 96 horas foi centrifugada a 1500rpm durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi liofilizado em presença de 5% de sacarose e 0,0075% de glicina (10). Após a liofilização, o título infectante (TI) do material, para camundongos de $14 \pm 1g$, inoculados por via intracerebral (IC), foi de $10^{5,1}$ DL50/0,03ml. Este material mantido a -20°C, conservou o TI durante um ano.

3. *Preparação da semente viral em monocamadas* - O correspondente a 2ml de vírus liofilizado foram ressuspensos com 2ml de meio PPM e adicionado de 500mcg de sulfato de protamina (7). Após o esgotamento

* Gentilmente fornecido pelo Dr. Oscar Larghi - Laboratório do Centro Panamericano de Zoonoses (CEPANZO), Buenos Aires, Argentina.

prévio de PPC, o volume total da semente viral foi distribuído em garrafa Falcon de 250ml de capacidade, com crescimento celular de 48 horas em monocamada confluente. Em seguida ao período de adsorção de 1 hora e 30 minutos, a suspensão de vírus não adsorvida foi esgotada e ao frasco foram adicionados 25ml de PPM. A cultura foi incubada em estufa a 33°C durante 96 horas e o pH ajustado a 7,1 - 7,6 com solução de bicarbonato de sódio a 7%, sempre que necessário. O TI obtido foi de $10^{5,19}$ DL50/0,03ml, em camundongos de 14 ± lg.

4. Preparação da semente viral em suspensão celular - Um litro de suspensão celular de 48 horas de cultivo, com 2×10^6 células/ml, foi centrifugada a 1500rpm por 10 minutos e o meio PPC foi esgotado. À suspensão celular foram adicionados, aproximadamente, 200ml de PPM e 10ml de suspensão obtida conforme o item 3, permanecendo sob agitação magnética durante uma hora a 33°C, para adsorção células/vírus. Em seguida, foram adicionados 800ml de PPM e o cultivo mantido a 33°C, com agitação constante de aproximadamente 200rpm. O pH foi reajustado sempre que necessário a 7,4 - 7,6, por adição de solução de bicarbonato de sódio a 7%. Um outro frasco com 1000ml de suspensão de células foi tratado de modo idêntico porém, neste, ao PPM foi adicionado 0,4% de albumina bovina, fração V. Ambos os frascos foram cultivados durante 120 horas. As contagens iniciais revelaram $0,7 \times 10^6$ /células/ml em cada frasco, respectivamente. As células do frasco número 1 foram inoculadas com 0,07 partículas virais/célula, enquanto que as do nº 2 (com albumina) o foram com 0,046 partículas virais/células. O TI da suspensão viral semente usada foi $10^{5,19}$ /0,03ml DL50.

5. Desenvolvimento em tanque - Após 48 horas de cultivo a 36-37°C, 100 litros de suspensão celular com 2×10^6 células/ml, foram mantidos em repouso durante 12 horas a 4°C, esgotado o PPC e adicionados aproximadamente 50 litros de PPM a 33°C e 1,5 litros da semente viral obtida conforme descrito no item 4. A suspensão células-vírus foi agitada a 20rpm durante uma hora e, em seguida, foi adicionado o restante de PPM para completar o volume. A agitação foi elevada para 200rpm, com introdução de ar esterilizado sob a pressão de 0,5 quilos/pol.², na câmara superior do tanque. O cultivo foi mantido a 33°C durante 96 horas com pH mantido a 7,2.

6. Coleta e inativação do vírus - Após o cultivo, a suspensão viral foi centrifugada sob condições de esterilidade, em centrífuga Alfa Laval e, a seguir, o sobrenadante foi recolhido em tanque de aço inoxidável com capacidade de 200 litros e inativado pela adição de 60ml de acetiletilenimine (AEI) (10), durante 24 horas a 4°C, sob agitação constante de 200rpm. O AEI, após o período de inativação, foi neutralizado pela adição de 0,2% de solução M de tiossulfato de sódio.

7. Preparação de vacina - À suspensão viral inativada, foram adicionados sacarose e glicina, obtendo-se concentração final de 5% e 0,0075%, respectivamente. Quando para uso bovino, foi ainda adicionado 25% de gel de hidróxido de alumínio (2,5g% de hidróxido), permanecendo a suspensão em agitação constante de 100rpm a 4°C durante 24 horas, seguida de repouso por três dias. Ao final, 25% do volume total do sobrenadante foi retirado por sifonagem. Após a embalagem, o produto final foi estocado a 4°C.

8. Testes - contagens celulares - Realizadas a cada 24 horas durante o cultivo da suspensão celular, em câmara de Neubauer, corada pelo azul de Evans, para diferenciação de células vivas e mortas.

*Imunofluorescência** - A cada 24 horas, a partir do 2º dia de cultivo, uma amostra de suspensão celular infectada foi colhida e examinada

* Conjugado fornecido pelo CEPANZO.

por imunofluorescência direta (4) para determinação do momento ideal de coleta do vírus. Previamente estabelecemos que a coleta seria feita quando 80% ou mais das células se apresentassem infectadas. Provas de esterilidade realizadas após a adição do AEI quando, presumivelmente, já tivesse ocorrido a inativação viral e efetuadas por sementeira de 4,0ml do produto em 300ml de tioglicolato* e a 300ml de meio Sabouraud*. O primeiro foi mantido em estufa a 37°C durante 10 dias e, o segundo à temperatura ambiente durante 14 dias.

Prova de inativação viral - Aliquotas de 0,03ml da suspensão viral diluída a 1/10 em solução salina, foram inoculadas em lotes de 16 camundongos de 4-6 dias de idade por via IC. Um outro lote semelhante, com animais pesando 15g, foi inoculado por via IC com 0,03ml de vacina não diluída. Os animais foram observados durante 14 dias.

Prova de eficiência da vacina - Realizada segundo os testes de NIH (14), Habel (6), em camundongos, e de Koprowski (9), em cobaias e hamsters com amostra de CVS. Os testes de NIH e Habel foram executados no CEPANZO, no Ministério da Agricultura, São José, Estado de Santa Catarina e na Pfizer Química Ltda., respectivamente. Os de Koprowski, apenas na Pfizer Química Ltda.

Provas finais de esterilidade - Após o envasamento, 1ml de cada frasco dos dois tipos de vacinas, selecionados ao acaso foi semeado em tubos contendo 40ml de meio de tioglicolato, mantido em incubação durante 10 dias a 37°C.

Provas de soroneutralização - Realizada de acordo com a técnica de Koprowski, recomendada pela OMS (1).

Desenvolvimento de anticorpos em bovinos - 11 bovinos da raça zebu, com aproximadamente 1,5 anos de idade, pesando entre 180 e 200 quilos, foram vacinados por via subcutânea com 5ml de vacina adsorvida ao hidróxido de alumínio. O nível de anticorpos foi determinado pela prova de soroneutralização (1) (SN), 30 dias após a vacinação.

Prova de proteção em bovinos - Dois lotes de 5 bovinos da raça zebu, mestiços, de aproximadamente 1,5 anos de idade, pesando entre 130 e 220 quilos, receberam por via subcutânea a vacina adsorvida ao hidróxido de alumínio. O primeiro lote recebeu 3ml do produto vacinante e, o segundo, 5ml. O nível de anticorpos determinado pela prova de SN, foi 30 dias após a vacinação (1). A proteção foi observada pela inoculação, no 30º dia após a inoculação da vacina, de 4×10^8 DL50 (camundongo) de vírus râbico desafiante, cepa nº 2258** (isolado de morcego naturalmente infectado), por via intramuscular. Um terceiro lote de cinco animais, não vacinados, serviram como testemunhas.

Vacinação de cobaias com vírus PV não inativado - Grupos de 10 cobaias cada, de 500g, foram vacinados por via intramuscular (IM) com os seguintes volumes de vacina: 0,25ml de vacina não diluída, 0,25ml de vacina diluída a 1/10 em solução salina e 0,25ml de vacina diluída a 1/100 em solução salina. No 21º dia após a vacinação todos os animais foram desafiados com o vírus CVS segundo o teste de Koprowski (9).

Resultados

Os ensaios iniciais necessários para a obtenção da semente viral (Tabela 1), foram realizados em escala laboratorial, no volume de um

* Difco Laboratories.

** Gentilmente cedido pelo Prof. Moacyr R. Nilsson, do Instituto Biológico, SP.

litro de suspensão celular. O experimento constante da Tabela 2, foi realizado em meio PMM adicionado de albumina bovina.

Tabela 1 - Evolução do cultivo para a produção da semente viral e os respectivos títulos infectantes, a partir de 48 até 120 horas após a inoculação do vírus PV

	Número de células por ml de suspensão $\times 10^6$					
	Inicial	24h	48h	72h	96h	120h
Vivas	0,70	0,51	0,50	0,66	0,36	0,41
Mortas	N.R.*	0,18	0,32	0,36	0,41	0,45
DL ₅₀ /0,03ml	N.R.*	N.R.*	3,00	3,69	3,50	4,64

Proporção inicial vírus/célula: 0,07 partículas/célula

* Não realizado.

Tabela 2 - Evolução do cultivo celular em meio PPM adicionado de 0,4% de albumina bovina, fração V, para produção de vírus semente e respectivos títulos infectantes, a partir de 24 até 120 horas após a inoculação do vírus PV

	Número de células por ml de suspensão $\times 10^6$					
	Inicial	24h	48h	72h	96h	120h
Vivas	1,1	1,3	1,70	1,70	1,50	1,44
Mortas	N.R.*	0,08	0,28	0,30	0,33	0,40
DL ₅₀ /0,03ml	N.R.*	N.R.*	3,00	4,12	5,5	4,87

Proporção inicial vírus/célula: 0,046 partículas/célula

* Não realizado.

Tabela 3 - Contagem de células vivas cultivadas em meio PPM, com introdução de ar esterilizado após a inoculação do vírus PV, examinada a partir da inoculação do vírus (hora zero) até 96 horas após

Horas de cultivo	0	9	17	25	30	33	37	41	49	57	61	65	73	96
Número de células $\times 10^6$	2,00	2,30	2,06	1,76	1,46	1,55	1,69	1,93	1,67	1,38	1,42	1,64	1,23	0,97

Proporção vírus/célula: 0,0005 partículas/célula; T.I. na 96a. hora = $10^{4,52} \text{ DL}_{50}/0,03\text{ml}$.

Discussão

Os resultados constantes das Tabelas 1 e 2 demonstraram que a adição de albumina bovina ao meio de cultura, não só manteve as células vivas por tempo maior, como se observou após as primeiras 24 horas de cultivo como, também, permitiu que parte delas se multiplicassem até 72 horas após o início do processo. Possivelmente, por estas razões, um número maior de células estaria disponível para ser infectado com partículas virais neo-formadas, possibilitando a obtenção de título infectante mais elevado. A albumina bovina parece agir abreviando o

O experimento cujos resultados constituem a Tabela 3, foi conduzido em tanques de 150 litros com meio PMM, com introdução de ar esterilizado. A contagem de células evoluiu até 90 horas após a inoculação do vírus e constituiu o primeiro ensaio em escala industrial.

A patogenicidade do vírus PV na 7a. passagem após recebimento do Cepanço, em uso nas experiências acima delineadas, esteve muito reduzida ou praticamente nula, de acordo com observações realizadas em cobaias cujos resultados encontram-se na Tabela 8. A imunogenicidade do vírus manteve-se em níveis elevados.

tempo de cultivo; a sua adição permitiu a produção máxima de vírus em 96 horas ($105,5 \text{ DL}_{50}/0,03\text{ml}$) (Tabelas 1 e 2) que é economicamente importante na produção industrial. Apesar de ser substancialmente menor no lote que continha albumina (0,046 partículas/célula), a proporção vírus/células evidenciou um título infectante superior à partida cujos resultados estão contidos na Tabela 1 (0,07 partículas/célula).

Face a estes resultados, o processo foi transferido para escala industrial (Laboratórios Pfizer Química Ltda.), utilizando-se tanque de 150 litros de capacidade, com 100 litros de suspensão celular. Os resultados obtidos, encontrados na Tabela 3, demonstraram a sua viabilidade. Embora a albumina não tenha sido adicionada e os resultados finais tenham sido semelhantes ao piloto, quer nos parecer que as condições de aeração dos tanques tenha permitido uma superior multiplicação celular e viral.

Quando pelo menos 80% das células estavam infectadas, foi preparada uma partida experimental de vacina (canina e bovina). Os resultados dos diversos ensaios a que foram submetidos estes tipos de vacinas principalmente o de potência pelo método NIH, foram bastante satisfatórios (Tabelas 9 e 10). Mesmo o teste de Koprowski, recomendado para vacinas anti-rábicas não inativadas, apresentou resultados satisfatórios em hamsters e cobaias (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4 - Resultados dos testes de proteção, segundo Koprowski, em hamsters de $180 \pm 5\text{g}$

Tipo de vacina	Volume de vacina inoculada	Via de inoculação	Nº de hamsters desafiados	% de proteção
Canina	0,5ml	intramuscular	28	96,5
	0,25ml	intramuscular	29	87,0
	0,025ml	intramuscular	21	28,0
Bovina	0,5ml	subcutânea	22	100,0
	0,25ml	subcutânea	30	80,0
	0,025ml	subcutânea	29	31,0
Testemunhos	Vírus CVS a 1/800	intramuscular	20	100,0% de mortos

Tabela 5 - Resultados obtidos no teste de proteção segundo Koprowski, em cobaias de 450-500g

Tipo de vacina	Volume de vacina	Via de inoculação	Número de cobaias	% de proteção
canina	0,5ml	subcutânea	10	80
	0,25ml	subcutânea	10	100
Testemunhos		vírus CVS a 1/40		100% de mortes

Nos primeiros animais, os resultados são aparentemente paradoxais uma vez que a dose 50% inferior induziu a uma proteção relativamente mais elevada. Fato semelhante observado com outros tipos de vacinas (5), permite acreditar que a dose de vírus inativados tornariam as cobaias mais sensíveis à ação patogênica da suspensão desafiante. Como este fenômeno foi observado apenas com cobaias, não recomendamos o emprego desse animal nos testes de Koprowski.

A vacina adsorvida ao hidróxido de alumínio induziu em bovinos, a formação de anticorpos em títulos relativamente elevados um mês após (Tabela 6), o que concordou com as observações realizadas por Larghi (11) com a vacina produzida em células em monocamada. Por outro lado, a Tabela 7 demonstra que nível adequado de proteção pode ser adquirido contra o desafio de $4x 10^8 \text{ DL}_{50}$ (camundongo), de vírus isolado de morcego, com a inoculação de 3ml da vacina por via subcutânea (SC). Como um dos animais que apresentava título SN relativamente baixo (1/5) resistiu à dose desafiante, acreditamos que a imunidade mediada por células deve desempenhar papel importante na proteção (5).

As passagens sucessivas de vírus rábico em sistemas celulares, sem

retorno ao animal, pode induzir ou mesmo anular a sua patogenicidade para animais suscetíveis, quando inoculados por via SC.

Tabela 6 - Resultados dos testes de SN de 11 bovinos, realizados 30 dias após a inoculação da vacina adsorvida em hidróxido de alumínio

Animal nº	Título SN	
	antes da vacinação	30 dias após a vacinação
93	<1/2	>1/10 <1/50
109	<1/2	<1/10
118	<1/2	1/10
123	<1/2	<1/10
124	<1/2	>1/10 <1/50
125	<1/2	<1/10
128	<1/2	>1/50 <1/250
134	<1/2	>1/50 <1/250
161	<1/2	1/250
176	<1/2	>1/10 <1/50
180	<1/2	1/250

DL₅₀ do vírus CVS = 10^{6,0}/0,03ml - 90min.
a 37°C
Nº de DL₅₀ inoculadas = 46.

Tabela 7 - Resultados dos testes de SN e de proteção em 2 lotes, cada um com cinco bovinos zebus mestiços, inoculados respectivamente, com 3,0ml e com 5,0ml de vacina adsorvida em hidróxido de alumínio

Animal nº	Sexo	Vacina ml	Proteção	SN	
				antes da vacinação	após a vacinação*
1	M	3	sobreviveu	<1/2	>1/25 <1/125
3	F	5	sobreviveu	<1/2	1/25
4	M	5	sobreviveu	<1/2	>1/25 <1/125
5	M	3	sobreviveu	<1/2	>1/25 <1/125
7	M	3	sobreviveu	<1/2	1/5
8	M	5	sobreviveu	<1/2	1/25
9	M	5	sobreviveu	<1/2	1/25
10	M	5	sobreviveu	<1/2	>1/125
12	M	3	sobreviveu	<1/2	>1/125
13	M	3	sobreviveu	<1/2	>1/125
Testemunhos (não vacinados)					
2	M	-	morto	<1/2	-
6	M	-	sobreviveu	<1/2	-
11	M	-	morto	<1/2	-
14	M	-	morto	<1/2	-
15	M	-	morto	<1/2	-

* Foram utilizadas 15DL₅₀.

O mesmo parece ter ocorrido com a amostra PV na 7a. passagem em nosso laboratório. Resultados semelhantes foram obtidos por Larghi (comunicação pessoal). Deve ser salientado que a dose de 0,0025ml foi, ainda, suficiente para conferir 80% de proteção ao lote de 10 cobaias vacinadas por via IM (Tabela 8).

Tabela 8 - Prova de imunogenicidade do vírus PV de 7a. passagem, não inativado, para cobaias de 500g, desafiadas com o vírus CVS

Cobaya nº	Via	Inoculação		Inocuidade* vivos/mortos	Proteção (Koprowski) %
		Título do vírus (DL ₅₀)	Volume		
10	subcutânea	10 ^{4,5} /0,03ml	0,25	10/10	100
10	subcutânea	10 ^{4,5} /0,03ml	0,25 a 1/10	10/10	100
10	subcutânea	10 ^{4,5} /0,03ml	0,25 a 1/100	10/10	80
10 testemunhos		intramuscular		80% de mortes	

* Até 21 dias após inoculação.

Tabela 9 - Resumo dos protocolos das provas de eficiência com a vacina de uso canino e bovino*

Teste	Vacina	
	Canina	Bovina
Esterilidade	Satisfatório	Satisfatório
pH	8,45	8,15
Inocuidade	Satisfatório	Satisfatório
Habel		
título final	105,12 log	10 ^{4,25} log
proteção	132.000 DL50	17.782 DL50

* Realizado no Setor de Controle de Vacina Anti-Rábicas do Serviço de Defesa Sanitária Animal de Florianópolis.

Conclusões

1. A amostra PV de vírus rábico replica-se satisfatoriamente em células BHK-21, clone 13 cultivadas em suspensão.
2. A vacina anti-rábica produzida por este método foi eficiente para a profilaxia da doença rábica em cães e bovinos.

Agradecimentos

Aos técnicos da Pfizer Química Ltda., Dr. Raul da Rocha Medeiros Neto e Sr. Argemiro Torres Nogueira, pela colaboração e facilitação de uso dos laboratórios durante estudo.

Referências Bibliográficas

1. Atanasiu, P. - Quantitative assay and potency test of antirabies serum and immunoglobulin. In: - Kaplan, M.M. & Koprowski, H., eds. - Laboratory techniques in rabies. Geneva, World Health Organization, p. 314-318, 1973.
2. Atanasiu, P.; Favre, S.; Tsiang, H. & Ribeiro, M. - A propos des vaccins antirabiques de cultures cellulaires. In: - International Symposium on Rabies (II), Lyon, 1972, Symp. Series Immunobiol. Standard, vol. 21, p. 157-161, 1974.
3. Chapman, W.G.; Ramshaw, I.A. & Crick, J. - Inactivated rabies vaccine produced from the Flury LEP strain of virus grown in BHK-21 suspension cells. Appl. Microbiol., 26:858-862, 1973.
4. Dean, D.J. & Abelseth, M.K. - The fluorescent antibody test. In: - Kaplan, M.M. & Koprowski, H., eds. - Laboratory techniques in rabies. Geneva, World Health Organization, p. 73-84, 1973.
5. Guidolin, R. - Contribuição ao estudo imunitário da vacinação anti-rábica. Piracicaba, Faculdade de Odontologia UNICAMP, 1976. (Tese).
6. Habel, K. - Habel test for potency. In: - Kaplan, M.M. & Koprowski, H., eds. - Laboratory techniques in rabies. Geneva, World Health Organization, p. 276-278, 1973.

Tabela 10 - Teste de potência pelo método NIH*

	Vacina	
	Canina	Bovina
Valor antigênico	3,9	10,3
Valor antigênico mínimo requerido	0,4	0,4

* Realizados no Centro Panamericano de Zoonoses - Argentina.

7. Kaplan, M.M.; Wiktor, T.J.; Maes, R.F.; Campbell, J.B. & Koprowski, H. - Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: construction of a single-cycle growth curve. *J. Virol.*, 1:145-151, 1967.
8. Kissling, R.E. - Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98:223-225, 1958.
9. Koprowski, H. - Guineapig potency test for chicken-embryo vaccine. In: - Kaplan, M.M. & Koprowski, H., eds. - *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, World Health Organization, p. 287-291, 1973.
10. Larghi, O.P.; Savy, V.L.; Nebel, A.E. & Rodriguez, A. - Ethylenimine inactivated rabies vaccine of tissue culture origin. *J. Clin. Microbiol.*, 3:26-33, 1976.
11. Larghi, O.P. - Vacuna antirrábica en cultivos celulares para uso animal. *Anais Seminário sobre Técnicas de Controle da Raiva*, III, São Paulo, novembro, 1979.
12. McPherson, I. & Stoker, M. - Polyoma transformation of hamster cell clones: an investigation of genetic factors affecting cell competence. *Virology*, 16:147-151, 1962.
13. Radlett, P.S.; Telling, R.C.; Stone, C.J. & Witeside, J.P. - Improvement in the growth of BHK-21 cells in submerged culture. *Appl. Microbiol.*, 22:534-537, 1971.
14. Seligmann Jr., E.B. - The NIH test for potency. In: - Kaplan, M.M. & Koprowski, H., eds. - *Laboratory techniques in rabies*. Geneva, World Health Organization, p. 279-286, 1973.

EFFICACY OF THE Y MEDIUM FOR RECOVERY OF SHIGELLA FLEXNERI FROM STOOLS

Marcelo Magalhães
& Marlene Andrade

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

Summary

As a result of introduction of the Y medium in the enteric routine the isolation rate of *Shigella flexneri* nearly doubled. Among 80 positive cultures, the Y medium detected 36 (45%) strains that were missed on Hektoen agar plates.

Resumo

Eficácia do meio Y para recuperação de *Shigella flexneri* de fezes

Após introduzir o meio Y na rotina de enterobactérias, o índice de isolamento de *Shigella flexneri* praticamente duplicou. Entre 80 culturas positivas, o meio Y surpreendeu 36 (45%) linhagens que não foram detectadas nas placas de agar Hektoen.

Recent reports indicate *Yersinia enterocolitica* as a significant cause of human diarrhea (Soltész, L.V. & col., Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, 88:11-16, 1980; Weissfeld, A.S. & col., J. Clin. Microbiol., 11:196-197, 1980). Therefore, attempts to isolate *yersinia* are strongly desirable in clinical bacteriology laboratories. With this aim we introduced in our enteric routine a newly developed selective agar, the Y medium (Soltész, L.V. & col., Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect. B, 88:11-16, 1980).

All stool samples submitted to bacteriological examination between 15 January and 15 April 1981 were directly plated on Hektoen enteric agar (HE; Difco Laboratories), the medium currently used in this laboratory for isolation of *Shigella*, and Y medium for *Yersinia*. HE plates were incubated at 37°C for 24h whereas the Y medium was incubated at 29°C for 48h. After incubation, suspicious colonies from both media, were screened in Russel double sugar agar, lysine-iron agar, and Christensen urea slants (Merck), and identified by carrying out standard procedures (Martin, W.J. & Washington II, J.A. - Enterobacteriaceae, p. 159-219. In: - Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler Jr., W.J. & Truant, J.P., eds. - Manual of clinical microbiology. 3.ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980). Determination of the serotypes were done by Bernard Rowe at the Enteric Reference Laboratory, London.

Of the 1150 specimens examined one (0.09%) yielded *Y. enterocolitica* serotype 0:3 and 176 (15.3%) were positive for shigellae. Table 1 shows the comparative data for isolation of shigellae from HE and Y media. Y medium proved more effective for *S. flexneri*, having found 36 (45.0%) strains that were missed on HE. Thus, on the basis of the total number of shigellae isolated, introduction of the Y medium in the routine work increased the recovering rate of *Shigella* from 12.2

to 15.3%. The serotypes of *S. flexneri* which only were recovered from the Y medium are shown in Table 2. They were not different from those currently found among the strains isolated on other enteric media.

Table 1 - Comparison between HE and Y media for recovering shigellae^a

Species	HE positive Y positive	HE positive Y negative	HE negative Y positive
<i>S. dysenteriae</i> 2	4(100) ^b	0(0)	0(0)
<i>S. flexneri</i>	38(48)	6(7)	36(45)
<i>S. boydii</i>	0(0)	15(100)	0(0)
<i>S. sonnei</i>	0(0)	77(100)	0(0)

a. Stools from 1150 persons were examined

b. No. (%) of positive cultures.

Table 2 - Serotyping^a of *S. flexneri* that only were recovered from the Y medium

Serotype	Subserotype	No. of strains
1	1b	3
2	2a	15
	2b	2
3	3a	8
4	4a	8

a. Carried out at the Public Health Laboratory in London.

The 36 isolates were distributed among four serotypes, and 31 (86.1%) of them belonged to one of three subserotypes (2a; 3a; 4a).

Shigellae are delicate enterobacteria. The inoculation of fresh stools on several plates of plain agar is the best way to isolate the maximum number of shigellae (Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972, 362p.). Thus, it was a great surprise that many strains of *S. flexneri* missed on HE could be recovered from a highly selective agar which is inhibitory for most enterobacteria and pseudomonads. Several variables must have accounted for that discrepancy between the two media, such as inoculum size, incubation time, and temperature of incubation. In fact, temperature and time of incubation have influence on the isolation rate of shigellae and salmonellae (Taylor, W.I. & coll., Appl. Microbiol., 25:940-944, 1973). However, in the present investigation, it appears that the better capacity of the Y medium was due to its higher selectivity. The subcultures of all *S. flexneri* strains, which only were recovered from the Y medium, also grew well on HE plates.

This study points out that there is no perfect medium for the isolation of all species of *Shigella* and suggests that, even in the places where *yersinia* is very rare it would be worth using the Y medium because of its good performance for recovering *S. flexneri*.

Acknowledgement

We are thankfuls to Bernard Rowe for serotyping *S. flexneri* isolated and Daise Falcão for serotyping the strain of *Y. enterocolitica*.

LEPTOSPIRA INTERROGANS, SEROVAR COPENHAGENI, ISOLATED FROM A DOG IN BELO HORIZONTE, BRAZIL

Fernando Cordeiro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA
Unidade de Pesquisa de Patologia Animal
Km. 47 da Antiga Rio-São Paulo
23460 Seropédica RJ, Brasil

& Catherine R. Sulzer

World Health Organization, Food and Agriculture
Organization, Collaborating Center for
the Epidemiology of Leptospirosis
Center for Disease Control
Atlanta, GA 30333 USA

Summary

The leptospiral strain Cf-1 (LT 63-72), isolated from the urine of a dog with clinical signs compatible with leptospirosis, was identified by the cross agglutinin-absorption test as being identical to the serovar *copenhageni*, of the serogroup *Icterohaemorrhagiae*. This was the first isolation of *Leptospira* from a dog in the State of Minas Gerais, and the first time this serovar was identified in Brazil.

Resumo

Leptospira interrogans, sorovar *copenhageni*, isolado de cão em Belo Horizonte

A cepa de leptospira Cf-1 (LT 63-72), isolada da urina de um cão com sinais clínicos compatíveis com leptospirose, foi identificada pelo teste de absorção de aglutininas como sendo idêntica ao sorovar *copenhageni*, do grupo *Icterohaemorrhagiae*. Este foi o primeiro isolamento de leptospira de cão no Estado de Minas Gerais, e a primeira vez que foi identificado esse sorovar no Brasil.

Introduction

Canine leptospirosis has been described in several countries. In Brazil, it has not been studied, but the agent of the disease has been isolated and its presence demonstrated histopathologically (1, 3, 4).

Serological surveys have shown the presence of antileptospiral agglutinins in dog sera (2, 8).

The majority of infections are caused by serovars *canicola* and *icterohaemorrhagiae* (6) which have been isolated from dogs in Brazil and identified by Guida (4). Serovar *icterohaemorrhagiae* has also been isolated in São Paulo by Castro & col. (2).

Antibodies against other serovars have been demonstrated in dog sera in Brazil (2, 7).

In Belo Horizonte the disease has only been diagnosed clinically.

Rev. Microbiol., São Paulo, 14(1):38-41, Jan./Mar. 1983.

In April 1972, an icteric dog was brought to the Veterinary School clinic and attempts were made to isolate and identify *Leptospira*.

Material and Methods

Attempts were made to isolate *Leptospira* from blood and urine collected by venipuncture and stored in glass vials, with and without anticoagulant (oxalate) from an icteric dog. A small amount of plasma was recovered from the oxalated blood sample after sedimentation of the red blood cells; one drop on a slide with a cover slip, was examined under dark-ground microscopy (160 X magnification). The urine, collected by bladder puncture, was kept in a sterile vial, and centrifuged at 1,500rpm for 10 minutes at 4°C. A second centrifugation was done on the supernatant at 5,000rpm for 40 minutes. The sediment was examined in the same way as the plasma.

Blood and urine were inoculated into tubes of Fletcher's semi-solid medium. Four weanling guinea pigs were inoculated intraperitoneally: two with 1ml of plasma and two with 1ml of urine.

The serum was separated from the blood without anticoagulant and tested by the microscopic agglutination test (MAT). Sixteen live cultures of leptospires (Table 1) were used as antigens, grown for seven days in Korthof's or Stuart's media.

Table 1 - *Leptospira* serovars used as antigen in the microscopic agglutination test

Serogroup	Serovar	Strain
<i>Icterohaemorrhagiae</i>	<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA
Javanica	<i>javanica</i>	Veldrat Batavia 46
Canicola	<i>canicola</i>	Hond Utrecht IV
Ballum	<i>castelloni</i>	Castellón 3
Pyrogenes	<i>pyrogenes</i>	Salinem
Cynopteri	<i>butembo</i>	Butembo
Autumnalis	<i>autumnalis</i>	Akiyami A
Australis	<i>bratislava</i>	Jez Brastislava
Pomona	<i>pomona</i>	Pomona
Grippotyphosa	<i>grippotyphosa</i>	Moskva V
Hebdomadis	<i>mini</i>	Sari
	<i>wolffii</i>	3705
Sataviae	<i>sataviae</i>	Van Tienen
Tarassovi	<i>tarassovi*</i>	Perepelicin
Panama	<i>panama</i>	CZ 214 K
Samaranga	<i>patoc</i>	Patoc I

* Previously known as *kyos*.

Specific hyperimmune serum was prepared from the isolated strain by the inoculation of the live culture into a rabbit weighting approximately 4kg.

The leptospiral isolate was adapted to Ellinghausen's liquid medium, and the serogroup was tentatively identified by the agglutina-

tion screening test, using 12 antisera of known serovars (Table 2). Determination of the serovar was made using the cross agglutinin-absorption test, between the isolated strain and the serovar *copenhageni* (5).

Table 2 - Agglutination reactions of strain Cf-1 (LT 63-72) with antisera against 12 leptospiral serovars of the screening battery

Antisera		Reciprocal titer against antigen	
Serovar	Strain	Homologous	CF-1
<i>ballum</i>	Mus 127	6,400	-
<i>canicola</i>	Hond Utrecht	25,600	100
<i>copenhageni</i>	M 20	12,800	6,400
<i>bataviae</i>	Van Tienen	25,600	-
<i>grippotyphosa</i>	Moskva V	12,800	-
<i>pyrogenes</i>	Salinem	12,800	100
<i>autumnalis</i>	Akiyami A	25,600	200
<i>pomona</i>	Pomona	51,200	400
<i>wolffi</i>	3705	6,400	-
<i>australis</i>	Ballico	6,400	-
<i>tarassovi</i>	Perepelicin	6,400	-
<i>georgia</i>	LT 117	51,200	-

Results and Discussion

Organisms morphologically identical to leptospires were seen in the urine under dark-field microscopy.

The dog serum sample presented positive reactions for the serovars *bratislava* (1:3,200) and *icterohaemorrhagiae* (1:100).

Leptospires were isolated from the dog's urine, as well as from liver tissue of one affected guinea pig that was inoculated with urine.

The agglutination screening test indicated that the isolated strain Cf-1 (LT 63-72) belonged to the serogroup *icterohaemorrhagiae*, since it agglutinated at a high dilution with the serovar *copenhageni* (Table 2). The results of the cross agglutinin-absorption test showed that strain Cf-1 is serologically identical to the serovar *copenhageni*, strain M-20 (*icterohaemorrhagiae* serogroup) (Table 3).

Table 3 - Results of cross agglutinin-absorption test on leptospiral strain Cf-1 (LT 63-72) with serovar *copenhageni*, *icterohaemorrhagiae* group

Antiserum	Absorbed with	Reciprocal titer against antigen			
		Homologous		Absorbing strain	
		Before	After	Before	After
<i>copenhageni</i>	Cf-1	12,800	100	12,800	400
Cf-1	<i>copenhageni</i>	25,600	400	25,600	400

This is the first time the serovar *copenhageni* was isolated in Brazil, and it was the first isolation of leptospires from a dog in Belo Horizonte.

References

1. Azevedo, A.G. & Santos, J.A. - Sobre a ocorrência de leptospirose no Rio de Janeiro. 39 Cong. Bras. Med. Vet., Porto Alegre, Barcelos Botase, p. 115-163, 1946.
2. Castro, A.F.P.; Santa Rosa, C.A.; Troise, C. & Caldas, A.D. - Leptospirose canina em São Paulo: inquérito sorológico e isolamento de *L. icterohaemorrhagiae*. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 29:199-205, 1962.
3. Dacorso Filho, P. - Leptospirose canina. Hospital (Rio de Janeiro), 18:797-809, 1940.
4. Guida, V.O. - Estudos sobre a leptospirose canina. II - Isolamento e identificação de amostras de *Leptospira*. Rev. Bras. Biol., 8:541-543, 1948.
5. Kmety, E.; Galton, M.M. & Sulzer, C.R. - Further standardization of the agglutinin-absorption test in the serology of Leptospires. Bull. Wld. Hlth. Org., 42:733-738, 1970.
6. Newman, J.P. - Studies of canine leptospirosis. I - Evaluation of laboratory diagnostic procedures. II - Serologic determination of the incidence of latent infection in the Lansing, Michigan area. Am. J. Vet. Res., 11:405-411, 1950.
7. Santa Rosa, C.A.; Castro, A.F.P.; Silva, A.S. & Teruya, J.M. - Nove anos de leptospiroses no Instituto Biológico de São Paulo. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 29/30:19-27, 1969/70.
8. Veronesi, R.; Amato Neto, V. & Corrêa, M.O.A. - Leptospirose em cães da cidade de São Paulo: inquérito sorológico. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 16:78-84, 1956.

AVALIAÇÃO DE MÉTODOS "IN VITRO" PARA ESTUDO DA ATIVIDADE DA ASSOCIAÇÃO DE GENTAMICINA E CARBENICILINA EM PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Maria Helena Feres Saad
 Elsa Fuchshuber Rodrigues de Oliveira
 & Ítalo Suassuna

Serviço de Microbiologia e Imunologia
 Faculdade de Ciências Médicas UERJ
 Rua Prof. Manuel de Abreu, 48
 20550 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Trinta e duas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* foram expostas à ação combinada de gentamicina e carbenicilina, visando a detecção de efeito sinérgico, através do emprego de dois métodos: um teste de difusão em tiras de papel impregnadas com antibiótico e dispositos transversalmente, e o procedimento padrão - "teste do tabuleiro de xadrez" em meio líquido. O teste padrão mostrou ação sinérgica para 20 amostras. Com oito, o sinergismo foi visto apenas em relação a um antibiótico. Para as 12 amostras restantes observou-se efeito indiferente. O teste de difusão detectou sinergismo para 13 amostras e ação indiferente para 10 amostras, o que corresponde a 22% de resultados falso-negativos e 6% de falso-positivos, quando comparado aos resultados obtidos com o procedimento padrão.

Summary

An evaluation of "in vitro" methods for studying the combined activity of gentamicin and carbenicillin on *Pseudomonas aeruginosa*

Thirty two strains of *Pseudomonas aeruginosa* were exposed to the combined action of gentamicin and carbenicillin, aiming to detect a possible synergistic effect, by employing two methods: a diffusion test with antibiotic impregnated crossed paper strips and the standard procedure of checkerboard titration in liquid medium. The checkerboard titration test showed synergistic action for 20 strains. With eight of them, the synergy was seen in relation to only one of the antibiotics. For the remaining twelve strains an indifferent effect was observed. The diffusion test detected synergy for thirteen strains and an indifferent action for another group of 10 strains. This corresponds to 22% false-negative results and 6% false-positive ones, when related to the effects obtained with the standard procedure.

Introdução

O emprego de associações de antibióticos tem sido apontado como recurso válido de infecções por germes resistentes, destacando-se o uso simultâneo de gentamicina e carbenicilina nas infecções por *Pseudomonas aeruginosa* (12, 13, 14). Esta associação, no entanto, nem sempre apresenta ação sinérgica, podendo ser indiferente ou até mesmo antagonista (2, 4, 7, 10). Trata-se portanto, de efeito que varia de acordo com a amostra bacteriana testada.

O efeito imprevisível da associação impõe que se a avalie "in vitro" em cada caso, para melhor orientação terapêutica. Classicamente, emprega-se com esta finalidade o "teste do tabuleiro de xadrez" ou de diluição em caldo (1), por demais oneroso, em tempo e trabalho, para ser utilizado rotineiramente. Faz-se portanto, necessária uma avaliação de métodos mais simples nas condições do problema a ser investigado.

Com este intuito, selecionamos o teste descrito por Elek & Hilson (3) a ser comparado com o teste de referência.

Material e Métodos

Amostras bacterianas - Foram selecionadas 32 amostras de *P. aeruginosa*, identificadas de acordo com provas descritas por Lenette & col. (8). As amostras provieram de material clínico variado, obtido de pacientes hospitalizados ou atendidos ambulatorialmente no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Teste das tiras de papel de filtro - Este método, descrito por Elek & Hilson (3), consiste na utilização de duas tiras de papel de filtro aplicadas em ângulo reto sobre a superfície do meio de Mueller-Hinton sólido (M.H.M.) (Difco), em placas de Petri.

As tiras de 4 x 1cm, absorveram em média de 200 μ l cada uma, quando embebidas com as soluções de gentamicina ou carbenicilina. A concentração destes antibióticos nas tiras atingiu a cerca de 60 μ g e 600 μ g, respectivamente.

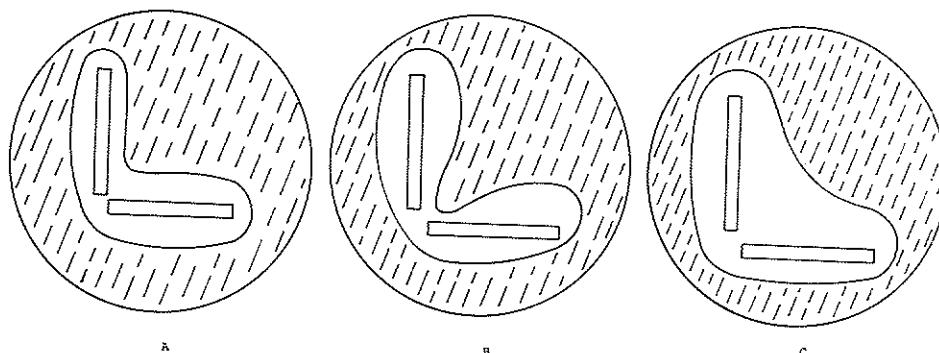
As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas, para a difusão dos antibióticos no meio, após o que as tiras foram removidas. Cobriu-se a superfície do meio com uma folha de papel de filtro com 90mm de diâmetro e acrescentou-se inóculo de 0,2ml, obtido por diluição de um cultivo de 18 horas a 37°C em meio de Mueller Hinton líquido (M.H.B.) (Difco). Esta diluição correspondeu ao tubo 0,5 da escala de MacFarland. A semeadura foi feita com "swab", passado 5 vezes na superfície do papel de filtro. Após incubação por 6 horas a 37°C, transferiu-se o papel para placa de Petri contendo M.H.M. adicionado de cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC-solução a 4% em 20% de álcool, esterilizada por filtração), para evidenciar o crescimento do microrganismo, pela redução à formazana, vermelha.

A leitura dos resultados fez-se de acordo com a zona de inibição observada em torno das tiras, cujo padrão correspondeu à descrição dos autores citados. As zonas de inibição puderam ser interpretadas como de ação sinérgica, antagônica ou indiferente (Fig. 1).

Teste do "Tabuleiro de xadrez" ou de diluição em caldo - Foram utilizadas placas de microtitulação ("Limbro") com 96 cavidades de fundo em U, comportando cada cavidade 200 μ l. As diluições de gentamicina foram distribuídas nas fileiras de sentido vertical, enquanto as de carbenicilina, no sentido horizontal. Desta forma, pudemos testar ambos os antibióticos isoladamente e em combinações e diferentes concentrações: as de gentamicina variaram de 1,25 a 25 μ g/ml e as de carbenicilina, de 12,5 a 250 μ g/ml.

Para cada teste foi feito também um controle negativo, no qual incubamos a amostra sem antibiótico. Os volumes utilizados foram 50 μ l de solução de gentamicina, de carbenicilina e do inóculo. Nos orifícios correspondentes a cada antibiótico isolado, adicionamos o mesmo volume de caldo, para manter as proporções de volume.

Figura 1 - Padrões de associação indiferente (A), antagônica (B) e sinérgica (C) observados no teste das tiras de papel de filtro



O inóculo foi padronizado por turvação equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, a partir de cultivo de uma noite em caldo. O meio de cultura empregado neste teste foi o M.H.B.

As microplacas foram incubadas por uma noite a 37°C e a seguir, utilizando dispositivo apropriado ou seja, suporte com pontas de aço (pregos) correspondentes às cavidades da microplaca, o inóculo de cada cavidade foi transferido para a superfície de agar M.H.B. em placas de formato retangular. Seguiu-se nova incubação por uma noite e leitura dos resultados.

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) corresponderam às maiores diluições dos antibióticos capazes de impedir o crescimento bacteriano, o qual foi avaliado pela turvação do caldo de cultura. As concentrações bactericidas mínimas (CBM) foram relacionadas às maiores diluições dos antibióticos que mostraram ausência de crescimento na semeadura feita em meio sólido, a partir do caldo sem turvação.

Consideramos sinérgico o efeito da associação, quando ocorria redução da CIM ou da CBM igual ou superior a quatro vezes em relação a cada antibiótico isoladamente. O aumento equivalente da CIM e da CBM foi interpretado como efeito antagônico.

Resultados

Os resultados obtidos pelo teste de diluição em caldo mostraram que para 12 amostras a associação de gentamicina e carbenicilina resultou em redução significativa da CBM para ambos os antibióticos. A associação foi indiferente para 12 amostras e para 8 constatamos redução significativa de CBM de apenas um dos antibióticos.

Cabe ressaltar que o sinergismo ocorreu apenas em determinadas combinações de ambos os quimioterápicos, geralmente nas de menores concentrações. Na única oportunidade em que se detectou antagonismo, este ocorreu na faixa de concentrações elevadas de ambas as drogas. A mesma amostra sofreu efeito sinérgico dos antibióticos em baixas concentrações.

Conforme observamos na Tabela 1, houve coincidência do método de diluição em caldo com o processo das tiras de papel de filtro em 23 ocasiões: em 10 casos a associação foi indiferente e em 13 casos foi sinérgica para um ou ambos os quimioterápicos.

Das 12 amostras com as quais o teste de diluição em caldo mostrou

associação sinérgica para ambos antibióticos, 9 forneceram o mesmo resultado com o processo das tiras de papel de filtro e em 3 a associação mostrou-se indiferente por este processo.

Tabela 1 - Resultados da comparação dos efeitos da associação de gentamicina e carbenicilina pelos processos das tiras de papel de filtro e de diluição em caldo

Método das tiras de papel de filtro	Método de diluição em caldo				
	Sgc	Sg	Sc	I	Total
S	9	1	3	2	15
I	3	0	4	10	17
Total	12	1	7	12	32

S. Sinergismo; I. Indiferente; Sgc. Sinergismo para gentamicina e carbenicilina; Sg. Sinergismo para gentamicina/efeito indiferente para carbenicilina; Sc. Sinergismo para carbenicilina/efeito indiferente para gentamicina.

Para 8 amostras em que a prova de diluição em caldo mostrou sinergismo para somente um antibiótico, o teste das tiras de papel de filtro revelou efeito sinérgico para metade das amostras, sendo indiferente para a outra metade.

Com 5 amostras houve discordância absoluta entre os resultados das 2 provas.

Considerando-se o processo de diluição em caldo como método de referência e tendo como objetivo a detecção de sinergismo, o processo das tiras de papel de filtro forneceu 7 (22%) resultados falso-negativos e apenas 2 (6%) resultados falso-positivos.

Discussão

Embora seja esperado o efeito sinérgico com associações de antibióticos dos grupos das penicilunas e dos aminoglicosídeos (6), este não ocorre invariavelmente; os resultados variam até mesmo com amostras pertencentes a mesma espécie (5, 11).

O estudo da ação de gentamicina e de carbenicilina sobre *P. aeruginosa* tem demonstrado resultados imprevisíveis, no que tange a observação de efeito sinérgico (7). Na avaliação da viabilidade do emprego do teste das tiras de papel de filtro (3) com este propósito os resultados obtidos em comparação com a prova de diluição em caldo, mostraram que, embora o primeiro ofereça vantagens em relação ao método de referência, quanto à simplicidade de execução, deixou de detectar 7 de 20 casos de sinergismo, correspondendo portanto a 22% de resultados falso-negativos. Destes, 3 corresponderam a amostras em que o sinergismo havia se dado em relação a ambos os antibióticos no teste do "tabuleiro de xadrez".

Observamos ainda que duas amostras revelaram efeito indiferente da associação no teste de referência, e efeito sinérgico no teste de triagem.

Lorian & Fodor (9), empregando o mesmo teste para o estudo da associação trimetropin e sulfametoazol, em 20 amostras de *Escherichia coli*, obtiveram excelente correlação dos resultados com a prova de diluição em caldo.

A falha na detecção dos casos de sinergismo pelo teste das tiras de papel de filtro poderia ser atribuída ao fato das concentrações dos antibióticos combinados serem diferentes daquelas usadas no teste de diluição em caldo. É sabido que o efeito sinérgico é detectado apenas

dentro de determinada faixa de combinação de concentrações, conforme foi verificado em nosso estudo e apontado por outros autores (15). No entanto, as concentrações dos antibióticos nas tiras de papel de filtro foram calculadas de modo a se manter a proporção usualmente empregada em disco, no teste de difusão em agar, concentrações estas que estão relacionadas às concentrações sanguíneas. Entretanto, as concentrações empregadas na prova do tabuleiro de xadrez, também são referidas aos níveis de concentração sanguínea. Portanto, é pouco provável que esta seja a causa maior da discordância. A influência da interação química entre os antibióticos nas concentrações mais elevadas utilizadas nas tiras de papel não está afastada.

A taxa de resultados falso-negativos encontrada no teste das tiras de papel de filtro leva-nos a aconselhar a sua utilização apenas como processo de triagem, uma vez que, quando pelo seu emprego, vier a ser detectado sinergismo, o resultado deve ser significativo já que foram infreqüentes os resultados falso-positivos. Para casos críticos específicos será aconselhável o teste de diluição seriada em "tabuleiro de xadrez".

Quanto à associação de outros aminoglicosídeos, verificações similares foram assinaladas. Heineman & Lofton (5) estudaram o efeito combinado da ticarcilina com gentamicina, tobramicina e amicacina, tendo sido os resultados variáveis não só de amostra para amostra, como de um antibiótico para outro. Através da CIM dos antibióticos, não lhes foi possível predizer o comportamento das combinações de antibióticos, nem o grau de sinergismo, quando este ocorria.

A variação de comportamento das amostras em relação a associação gentamicina-carbenicilina, que ora atua de forma sinérgica, ora indiferente, e até mesmo antagonica, leva-nos a considerar que, ao menos em infecções graves por *P. aeruginosa*, se submetam as amostras isoladas à verificação de sensibilidade àquela associação, visando oferecer melhor orientação terapêutica.

Agradecimentos

Agradecemos a Associação Brasileira das Indústrias Farmacêuticas pelo auxílio financeiro concedido para realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Barry, A.L. - The antimicrobic susceptibility test: principles and practices. Philadelphia, Lea Et Febiger, 1976.
2. Eickhoff, T.C. - In vitro effects of carbenicillin combined with gentamicin or polymixin B against *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Microbiol., 18:469-473, 1969.
3. Elek, S.D. & Hilson, G.R. - Combined agar diffusion and replicating techniques in the study of antibacterial substances. J. Clin. Pathol., 7:37-44, 1954.
4. Eykyn, S.; Phillips, I. & Ridley, M. - Gentamicin plus-carbenicillin. Lancet, 2:545-546, 1971.
5. Heineman, H.S. & Lofton, W.N. - Unpredictable response of *Pseudomonas aeruginosa* to synergistic antibiotic combinations in vitro. Antimicrob. Ag. Chemother., 13:827-831, 1978.
6. Jawetz, E. & Gunnison, J.B. - Studies on antibiotic synergism and antagonism: a scheme of combined antibiotic action. Antib. Chemother., 2:243-248, 1952.

7. Klein, R.A. & Meyer, R.D. - Synergy studies with *Pseudomonas aeruginosa* resistant to gentamicin and/or carbenicillin. *Cancer Chemother.*, 24:283-289, 1978.
8. Lenette, E.H.; Spaulding, E.H. & Truant, J.P. - Manual of clinical microbiology. 2.ed. Washington, American Society for Microbiology, 1974.
9. Lorian, V. & Fodor, G. - Technique for determining the bactericidal effect of drug combinations. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 5: 630-633, 1974.
10. Lynn, B. - Carbenicillin plus gentamicin. *Lancet*, 2:653-654, 1971.
11. Marks, M.I.; Hammerberg, S.; Greenstone, G. & Silver, B. - Activity of newer aminoglycosides and carbenicillin, alone and in combination, against gentamicin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 10:399-401, 1976.
12. Masuda, G.; Nakamura, K.; Yajima, R. & Saku, K. - Bacteriostatic and bactericidal activities of beta-lactam antibiotics enhanced by addition of low concentrations of gentamicin. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 17:334-336, 1980.
13. Nunnery, A.W.; Hamilton, W.D. & Ridley Jr., H.D. - Carbenicillin: in vivo synergism and combined therapy. *J. Infect. Dis.*, 122 (Suppl.):78-83, 1970.
14. Saslaw, S.; Carlisle, H.N. & Moheimani, M. - Comparison of gentamicin, and carbenicillin in *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in monkeys. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 3:274-278, 1973.
15. Wateworth, P.M. - Tests of combined antibacterial action. In: - Reeves, D.S.; Phillips, I.; Williams, J.D. & Wish, R., eds. - Laboratory methods in antimicrobial chemotherapy. Edinburgh, Churchill Livingstone, p. 41-49, 1978.

VIRULENCE FACTORS OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA* ISOLATED FROM PIGS

Antonio Fernando Pestana de Castro
Lucila Costallat Ricci
Aparecida Celli Paulista de Almeida
Margaretti Simões Oliveira

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

& David Emilio Santos Neves de Barcellos

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
Caixa Postal 2076
90000 Porto Alegre RS, Brasil

Summary

Twenty strains of *Yersinia enterocolitica* of serotype O3, chemotype 4, phagetype VIII, were isolated from pigs with diarrhea, and tested for the presence of virulence factors. The production of heat-stable enterotoxin (ST), assayed by the suckling mouse test, presented irregular results, suggesting differences between the ST of *Y. enterocolitica* and *Escherichia coli*. Evaluation of the ability to produce ST, using the rabbit and rat ileal-loop assay, presented negative results, with one exception. The assay of heat-labile enterotoxin (LT), using the modified passive-immunohemolysis test, also presented negative results. The strains of *Y. enterocolitica* studied did not show evidences of adhesins, using the mannose-resistant hemagglutination test, with red blood cells of human, bovine and guinea pig origin. The ability to cause keratoconjunctivitis in the guinea pig eyes (Serény test) was not detected in any strain, but most were able to invade HeLa cells.

Resumo

Fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica* isolada de suínos

Vinte amostras de *Yersinia enterocolitica* do sorotipo O3, quimiotípo 4 e fagotipo VIII foram isoladas de porcos com diarréia e examinadas quanto a presença de fatores de virulência. A produção de enterotoxina termoestável (ST), ensaiada pelo teste do camundongo recém-nascido, apresentou resultados irregulares, sugerindo diferenças entre a ST de *Y. enterocolitica* e *Escherichia coli*. Uma avaliação da capacidade de produção de ST, utilizando o teste de alça ligada em coelhos e ratos, apresentou resultados negativos, com apenas uma exceção. A verificação da produção de enterotoxina termolábil, através do teste da imunohemólise passiva modificado, apresentou resultados negativos. As amostras de *Y. enterocolitica* estudadas não mostraram evidências da presença de adesinas quando examinadas pelo teste de hemagglutinação manose-resistente, utilizando-se hemácias humanas, bovinas e de cobaias. A capacidade de causar ceratoconjuntivite em olho de cobaia (teste de Serény) não foi verificada em nenhuma das amostras estudadas, mas a maioria foi capaz de invadir células HeLa.

Introduction

Yersinia enterocolitica has been isolated from several animal species. Pigs are regarded as a reservoir for human infections, and there are some evidences between association of this bacteria and field cases of diarrhea (2).

The mechanisms of pathogenicity for this germ were obscure until recently. It is now known that the production of heat stable enterotoxin (ST) (3, 17), and the ability to invade HeLa cells (14, 15) and cause keratoconjunctivitis in guinea pigs (21), can explain the virulence of some serotypes. However, these factors have been thoroughly investigated in human isolates of *Y. enterocolitica* only (3, 17).

It appears there are no references in the literature about pathogenic mechanisms of *Y. enterocolitica* diarrhea in pigs.

Material and Methods

Strains - Twenty isolates of *Y. enterocolitica* (designated 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, Pen 2, Pen 10 and Pen 12), recovered from outbreaks of diarrhea in 8 different pig farms around the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, were examined.

The biochemical identification of the strains, was performed by means of the API 20 E System (Analytab Products Inc.), and the serotyping, chemotyping and lysotyping were carried out in the Centre National des Yersiniac, Institut Pasteur, Paris.

Assay of heat-stable enterotoxin - After cultivation for 48 hours at 26°C in the Casamino Acids-Yeast Extract (CAYE) medium (7) and in the medium described by Pai & Mors (17) the 20 cultures were centrifuged at 6.000rpm for 30 minutes. The supernatants were assayed using the suckling-mouse test (6), using five animals 2-3 days old for each sample. Four hours after the injection, the animals were killed, and results were considered positive when the ratio weight of intestines/weight of carcass was equal or higher than 0.085, for each batch of animals. Tests with results between 0.07 and 0.085 were repeated and samples showing values below 0.85, in all successive tests, were considered negative. At least four lots of five animals each, were used for sample.

The samples 22, 23, 24, 27, 29, 30, 31, 33, Pen 10 and Pen 12 were also assayed for ST production using the rat ileal-loop assay (19). Three loops were made in each animal, measuring about 10cm each, starting at the ileo-caecal junction, in the back-front direction. In each animal was inoculated: a. Positive control (*Escherichia coli* serogroup 0128 producing only ST); b. Negative control (CAYE medium) and, c. Test sample (supernatant of the cultures of the different *Y. enterocolitica* strains, grown on CAYE medium, incubated under agitation (150rpm) at 26°C for 48 hours). At least two animals were used for each sample in a volume of 0.5ml in each intestinal loop. Six hours after inoculation, the animals were killed. Values of the ratio, volume of fluid inside the loop (ml) lenght of the loop (cm) above 0.1ml/cm were considered positive, based on results obtained with the positive and negative controls.

The samples 22, 23, 24, 30 and Pen 12 were further assayed for ST production, with the use of the rabbit ileal-loop assay method (11).

The controls and test samples were prepared as described for the rat ileal-loop assay, using two rabbits for each test sample.

Assay of heat-labile enterotoxin - Cultures in CAYE medium incubated under agitation (150rpm) for 48 hours were used. After incubation, the cultures were treated with polymyxin (8), and examined using the modified passive immunehemolysis technique (5), without the addition of mitomycin.

Mannose-resistant hemagglutination test - The test and reagents were the same described by Jones & Rutter (13), for the assay of the K88 antigen of *E. coli*. As controls for the reaction *E. coli* K88- (Strain K12 M4) and K88+ (Strain G7 - 08:K87; K88a,b:H19) were used.

The ability to agglutinate human red blood cells (RBC) in the presence of D-mannose was also assayed, using RBC of the A group. The test was identical to that described by Evans & col. (9) for the identification of CFA/I antigen in *E. coli*. The assay of the CFA/II antigen followed the technique of Evans & Evans (10), using bovine instead of human RBC. As positive and negative controls, *E. coli* strains PB 176 and PB 176p were used, respectively.

Assay of invasive ability - Two tests were used: ability to invade HeLa cells (14), and the experimental infection of guinea pig eyes (21). In the later test, the inoculum was a culture of *V. enterocolitica*, incubated at 26°C for 48 hours, in the medium (17). The growth was suspended in 0.15M saline solution, and standardized to a concentration of 2×10^8 bacteria/ml. One guinea pig was used for each test, and 0,1ml of the suspension was inoculated in one of the eyes.

The other eye, left as negative control, was inoculated with *E. coli* K12 (M4). In each batch of tests, a positive control (*E. coli* 489) showing positive results in the Serény and HeLa cell invasion tests, was included.

Results

All strains showed a uniform biochemical pattern, and were identified as *V. enterocolitica*, serotype O3, chemotype 4 and phagetype VIII. All strains presented negative results, concerning LT production.

Table 1 - Results of the suckling-mouse test for the assay of heat-stable enterotoxin (ST) produced by *V. enterocolitica* strains

Strain nº	Culture medium used for ST production			
	CAYE (R ^{I/C}) ^a		Pai and Mor's (R ^{I/C})	
	Positive results	Negative results	Positive results	Negative results
22	1/5 ^b (0.13) ^c	4/5 (0.067)	1/4 (0.087)	3/4 (0.071)
23	2/6 (0.087)	4/6 (0.065)	2/5 (0.094)	3/5 (0.067)
24	1/6 (0.14)	5/6 (0.045)	0/4	4/4 (0.064)
26	1/5 (0.096)	4/5 (0.057)	0/4	4/4 (0.058)
30	2/5 (0.095)	3/5 (0.074)	0/4	4/4 (0.057)
Pen 10	1/5 (0.121)	4/5 (0.06)	0/4	0/4 (0.06)
Pen 12	0/5	5/5 (0.054)	2/4 (0.106)	2/4 (0.071)
15, 17, 18, 19, 20, 21, 25, 27, 29, 31, 32, 33, Pen 2		<0.07 ^c		<0.07 ^c

a. Ratio weight of intestine/weight of carcass; b. Number of lots of 5 mice each, whose results are either positive or negative; c. Mean value of R I/C.

Results for ST assay using the suckling-mouse test are presented in Table 1. The results obtained for the six strains producing ST on CAYE medium were very irregular, and in Pai and Mor's medium only 3 strains

produced ST. In this last medium, the results were also very irregular.

Table 2 - Comparison between the rabbit ileal-loop and the suckling mouse tests, for the assay of heat-stable enterotoxin (ST) produced by *V. enterocolitica* strains

Sample identification	Tests	
	Suckling-mouse	Rabbit ileal-loop
22	(+) ^a	0,011 ^b
23	(+)	0,043
24	(+)	0,05
30	(+)	0,08
Pen 12	(+)	0,241
Positive control (<i>E. coli</i> 0128 (ST+))	+	0,256
Negative control (CAYE medium)	-	0,015

a. (+) irregular results in the suckling mouse test (Table 1);
b. Values of the ratio volume of fluid inside the loop (ml)/size of the loop (cm) (average).

Results for ST assay on the rabbit ileal-loop test are presented in Table 2. Among the strains tested by this test, only strains P12 confirmed the results obtained with the suckling mouse test.

Results for ST production on the rat ileal-loop test are presented in Table 3. All strains presented negative results.

All the strains studied presented negative results in the mannose-resistant hemagglutination test, with human and bovine RBC. These results indicate absence of CFA/I and CFA/II antigens. Results for the assay of K88 antigen presented very low titers, never above 1:4, indicating absence of the K88 antigen.

The assay of invasiveness presented different results in the 2 tests used. In the Séreny test, all *V. enterocolitica* strains were negative (absence of ocular reaction). Using the HeLa cell invasion test, all but one strains (nº 20) were able to invade the cell line.

Table 3 - Results of the rat ileal-loop test for the detection of heat-stable enterotoxin (ST) produced by *V. enterocolitica* strains

Sample inoculated	R V/S ^a		
	Sample	Positive control <i>E. coli</i> 0128 (ST+)	Negative control (CAYE medium)
22	0,029 ^b	0,227	0,004
23	0,027	0,199	0,031
24	0,007	0,213	0,026
27	0,055	0,234	0,009
29	0,014	0,169	0,031
30	0,018	0,188	0,020
31	0,023	0,133	0,014
33	0,007	0,190	0,049
Pen 10	0,033	0,222	0,006
Pen 12	0,006	0,172	0,002

a. Ratio volume of fluid inside the loop (ml)/size of the loop (cm); b. Average values of R V/S.

Discussion

The pathogenesis of the diarrhea produced by *Yersinia enterocolitica* in humans and animals is still obscure. Several authors have suggested that the production of enterotoxin ST could explain the symptoms observed. Boyce & col. (3) detected the presence of this toxin in seven strains of the serotype 08, and demonstrated that it was similar to the ST produced by *E. coli* (concerning heat-stability), methanol solubility and intestinal dilatation in newborn mice). Enterotoxicogenicity was detected in different rates by different workers; Mors & Pai (15) described that 90.9% of *Y. enterocolitica* 03 included in their work were toxigenic, while Okamoto & col. (16) described that only six out of 23 strains of the serotype 03 (26.08%) produced ST.

The serotype 03 is one of the types most frequently found in association with human infection. Concerning this and two other biological markers (chemotype: 4 and phagetype: VIII), it is accepted that the pig is the main reservoir of the infection (12). In the present study, the 20 strains studied presented these characteristics. However, regarding ST production, the results are similar to those found by Okamoto & col. (16): only 6 (30%) out of 20 strains were able to produce this enterotoxin.

In spite of the inhibitory effect of glucose on ST producing by *E. coli* (1), the production of this toxin by *Y. enterocolitica* in the medium recommended by Pai & Mors (17) (containing 0,44% of this carbohydrate) was also studied. One sample (Pen 12), negative for ST production when grown on CAYE medium, produced the toxin in two out of four tests carried out with Pai and Mors medium. However, the total number of strains producing ST in the medium containing glucose was much lower than in the medium without the carbohydrate, which is in agreement with the data of Alderete & Robertson (1).

The use of the suckling mouse test for the detection of ST of *Y. enterocolitica* presented irregular results (Table 1). In the condition of our experiments, a single culture, assayed on different days, presented alternatively positive and negative results. So far we do not have any explanation for these findings. However, this difference of behavior between ST of *Y. enterocolitica* of pig origin and *E. coli* in the suckling mouse test, suggests marked differences between their toxins, at least concerning biological activities. In relation to *E. coli*, two types of enterotoxin ST have already been detected: STa and STb (4); therefore it is not surprising that the ST of *Y. enterocolitica* would be different of the ST produced by *E. coli*. Based of these facts, and in the finding that the production of ST "in vivo" by *Y. enterocolitica* has never been detected (3, 20), it is recommended that the production of enterotoxin ST by the 03 serotype would be better evaluated, as a virulence factor. The test in the rabbit (Table 2) showed that only one sample (Pen 12) was able to produce dilatation of the inoculated loop. These results are in disagreement with those obtained by Robins-Browne & col. (20), but they tested a small number of strains (three).

The gut ligated test in the rat did not show any reaction to the supernatants of several *Y. enterocolitica* strains, including those showing positive results in the suckling mouse test. Concerning LT production, negative results were also obtained by other workers (16, 18, 20).

Some workers have reported intestinal colonization by *Y. enterocolitica* after experimental infection of rabbits (19). Working with

strains of swine origin, we did not find evidence of mannose-resistant hemagglutination, using human, bovine and guinea pig RBC. These results indicate that CFA/I, CFA/II and K88 antigens were not present in the strains studied. So, in the present case, we can assume that colonization if positive, was mediated by adhesins not assayed in our work.

All the strains studied were not invasive, when examined using the Serény test. If we consider that all the strains studied belonged to the serotype O3, our data are in agreement with those reported by Mors & Pai (18): they observed that only strains belonging to the serotype O8 were able to cause keratoconjunctivitis in guinea pigs.

On the other hand, all strains but one were able to invade HeLa cells suggesting that invasibility among *Yersinia enterocolitica* is better detected in HeLa cells. Similar results have been described elsewhere (15, 22).

Apart from the commented need for better evaluation of ST of *Y. enterocolitica* as a possible virulence factor we presently support the opinion that the invasive ability, detected by the HeLa cell invasion test, is the sole mechanism that could explain its enteropathogenicity for pigs. In spite of the fact that in rabbits a correlation was demonstrated between HeLa cell invasion and enteritis, further studies to clarify the relationship between *Y. enterocolitica* infection and diarrhea in pigs are justified.

Acknowledgements

The authors are grateful to Dr. P.A.M. Guiné for the *E. coli* strains K88 positive and negative, to Dr. M.H.L. dos Reis for the *E. coli* strains CFA/II positive and negative, and to Prof. H.H. Mollaret for typing *Y. enterocolitica* strains, and the grants provided by CNPq and FINEP.

References

1. Alderete, J.F. & Robertson, D.C. - Nutrition and enterotoxin synthesis by enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*: defined medium for production of heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 15:781-788, 1977.
2. Barcellos, D.E.S.N. - LSHTM, London, 1977. (MS Dissertation).
3. Boyce, J.B.; Evans Jr., D.J.; Evans, H.G. & Dupont, H.L. - Production of heat-stable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immunol.*, 25:532-537, 1977.
4. Burgess, M.N.; Bywater, R.J.; Cowley, C.M.; Mullan, N.A. & Newsome, P.M. - Biological evaluation of a methanol-soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect. Immunol.*, 21:526-531, 1978.
5. Castro, A.F.P. de; Serafim, M.B.; Gomes, J.A. & Gatti, M.S.V. - Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 12:714-717, 1981.
6. Dean, A.G.; Ching, Y.; William, R.G. & Harden, L.V. - Test for *Escherichia coli* enterotoxins using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125: 407-411, 1972.

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 *E. coli*. *Infect. Immunol.*, 10:1010-1017, 1974.
9. Evans, D.G.; Evans Jr., D.J. & Tjoa, W. - Hemagglutination of human group A erythrocytes by enteroxotogenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immunol.*, 18:330-337, 1977.
10. 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.
11. Franceschi, A.P.; Castro, A.F.P.; Serafim, M.B. & Pustiglione Netto, L. - Estudos comparativos entre o teste da alça ligada do intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST) produzida por *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 8:123-128, 1977.
12. Highsmith, A.K.; Feeley, J.C. & Morris, G.K. - *Versinia enterocolitica*: a review of the bacterium and recommended laboratory methodology. *Hlth. Lab. Sci.*, 14:253-260, 1977.
13. 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.
14. Lee, W.H.; McGrath, P.P.; Carter, P.H. & Eide, E.L. - The ability of some *Versinia enterocolitica* strains to invade HeLa cells. *Can. J. Microbiol.*, 23:1714-1722, 1977.
15. Mors, V. & Pai, C.H. - Pathogenic properties of *Versinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 28:292-294, 1980.
16. Okamoto, J.; Ichikawa, H.; Kawamoto, Y.; Miyama, A. & Yoshi, S. - Heat-stable enterotoxin produced by *Versinia enterocolitica* isolated from patients. *Microbiol. Immunol.*, 24:401-408, 1980.
17. Pai, C.H. & Mors, V. - Production of enterotoxin by *Versinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 19:908-914, 1978.
18. Pai, C.H.; Mors, V. & Seemayer, T.A. - Experimental *Versinia enterocolitica* enteritis in rabbits. *Infect. Immun.*, 28:238-244, 1980.
19. Pierce, N.F. - Protection against challenge with *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by immunization of rats with cholera toxin/toxoid. *Infect. Immun.*, 18:338-341, 1977.
20. Robins-Browne, R.M.; Still, C.S.; Miliotis, M.D. & Koornof, H.J.- Mechanism of action of *Versinia enterocolitica* enterotoxin. *Infect. Immun.*, 25:680-684, 1979.
21. Serény, B. - Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: a preliminary report. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 2:293-296, 1955.
22. Une, T.; Zin-Yoji, H.; Maruyama, T. & Yanagawa, Y. - Correlation between epithelial cell "in vitro" and O-antigen groups of *Versinia enterocolitica*. *Microbiol. Immunol.*, 21:727-729, 1977.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Harrison, D.E.F.; Higgins, I.J. & Watkinson, R. - Hydrocarbons in biotechnology. London, Heyden & Son, 1980. US\$ 40.50.

O livro é constituído de 12 conferências que foram apresentadas no encontro organizado pelo Instituto do Petróleo, Inglaterra, em setembro de 1979. É o segundo de uma série, sendo o título do primeiro "The Oil Industry and Microbial Ecosystems". Será feita a tradução direta de cada um dos tópicos seguido de um breve comentário. Perspectivas históricas (J.R. Quayle) - O autor faz breves considerações sobre a provável atmosfera primária e secundária da terra e passa imediatamente a relatar os primeiros estudos de microbiologia de hidrocarbonetos, por exemplo *Botrytis cinerea* em 1895, os trabalhos de Söhngen no laboratório de Beijerinck na Holanda com *Bacillus methanicus* com interessantes detalhes. A melhor parte deste capítulo é a visão em termos de perspectivas de novos desenvolvimentos de importância para a biotecnologia de hidrocarbonetos, com ênfase única em microbiologia.

Interações de microrganismos com hidrocarbonetos (R.J. Watkinson) - Este capítulo é didaticamente organizado. É apresentado três principais mecanismos de interação inicial de hidrocarbonetos com a célula microbiana. Estes mecanismos são hipotéticos (o leitor não deve se esquecer da insolubilidade em água dos hidrocarbonetos, o que dificulta usá-los como substrato para os microrganismos). O autor organizou uma tabela, de importância indiscutível, onde apresenta vários microrganismos com seus substratos especiais (hidrocarbonetos) e a natureza de seus agentes emulsificantes com referências. Discute modificações citoplasmáticas de células transferidas de meio contendo succinato para ciclohexano como fontes de carbono (micrografias eletrônicas).

Produção de ácido orgânico a partir de hidrocarbonetos (L.M. Miall) - Basicamente, é focalizado neste capítulo a produção de ácido cítrico, a partir de parafina. O autor patenteou um processo de produção deste ácido por cultura contínua, utilizando-se de uma levedura.

Metanol como substrato: aspectos teóricos (C. Anthony) - O autor discute o assunto, levando-se em conta que metanol é o primeiro produto de oxidação do metano e, como tal, apresenta diversas vantagens sobre outros hidrocarbonetos como substratos tais como: não é explosivo (o que torna a operação com fermentadores mais segura), é líquido de fácil transporte, o metanol residual é facilmente removido do produto, oxigênio não é requerido, e há um grande número de bactérias e leveduras que crescem em metanol. O interesse imediato é a sua utilização na produção de proteína de unicelulares (SCP). São discutidas as vias de assimilação, a oxidação do metanol, a fosforilação oxidativa (não obstante tenha mencionado no início que oxigênio não é requerido), e o uso de metanol para produção de metabolitos (ceto-ácidos, ácidos carboxílicos, aminoácidos e vitaminas).

Proteína de unicelulares: tecnologia, economia e potencial futuro (G. Hamer & D.E.F. Harrison) - Como o sub-título deixa transparecer são abordados apenas aspectos gerais do processo depois de ter apresentado uma informação estatística que dá base e importância ao assunto de proteína de unicelulares a partir de hidrocarbonetos.

Transformações que utilizam células intactas (J.W. Drozd) - É a parte mais fraca do livro, por demais generalizada. Focalizam basicamente o assunto de células imobilizadas relacionando vantagens e desvantagens do processo.

Transformações por monoxigenase metânica (H. Dalton) - Monoxigenase

metânica tem a habilidade de colocar um único átomo de oxigênio numa grande variedade de hidrocarbonetos, o que apresenta uma grande possibilidade para a indústria petroquímica. O autor tem trabalhado com esta enzima de origem bacteriana "in vivo" e "in vitro" demonstrando muita vivência do assunto. Faz comentários sobre os microrganismos, a enzima, a oxidação de alcanos, alcenos, alicíclicos, aromáticos e heterocíclicos. Discute sobre a especificidade de doadores de elétrons e o uso de células intactas.

Transformações de hidrocarbonetos aromáticos (R.B. Cain) - A grande estabilidade dos anéis aromáticos recebeu uma atenção toda especial por parte dos editores, sendo este o capítulo mais completo do livro. Fica claro ao leitor que tudo o que se sabe sobre a biotransformação de hidrocarbonetos aromáticos por fungos, bactérias, algas e plantas superiores é aqui relatado. O autor discute o uso de mutantes.

Lipídios microbianos derivados de hidrocarbonetos (C. Ratledge) - Embora, no momento, há pouca oportunidade para este assunto, em termos de biotecnologia, o autor o explora profundamente, pois é pesquisador nesta área. É discutido o tipo de lipídios formados e microrganismos que crescem em alcanos. Mais especificamente são vistos ácidos graxos, ceras, lipídios extra-celulares e bioemulsificantes que são formados.

Possibilidades genéticas para expandir a ação de transformações microbianas (P.A. Williams & F.C.H. Franklin) - A maior parte do capítulo é um sumário muito bem feito dos processos genéticos de melhoramento usados em microbiologia. Apenas um caso concreto é citado em *P. putida* onde há um plasmídio degradativo de tolueno (TOL).

Microrganismos na extração de petróleo (A.D. Forbes) - O autor discute a importância e urgência de se usar qualquer método que possibilite o aumento da extração de petróleo. É discutido o uso de microrganismos e muito bem apresentado os fatores que influenciam o bom desempenho tais como, temperatura, pressão, salinidade, aerobiose ou anaerobiose, fonte de carbono e nutrientes. É feita uma revisão do assunto com dados específicos de experimentos já realizados e uma projeção para o futuro.

Eletroenzimologia e células de biocombustível (I.J. Higgins; R.C. Hammond; E. Plotkin; H.A.O. Hill; K. Uosaki; M.J. Eddowes & A.E.G. Cass) - Embora relacionados, os dois assuntos são apresentados independentes pelos autores. No primeiro caso, é discutido o grande uso prático dos eletrodos na utilização de oxigenases em geral e mais especificamente monoxigenases no suprimento do poder redutor. No segundo caso, é descrito o que venha ser uma célula de biocombustível (artificial) e o uso de células bacterianas imobilizadas como células produtoras de biocombustível.

O livro não apresenta os recursos modernos das tipografias, naturalmente porque desejo-se uma impressão rápida. É entretanto, de leitura fácil, atualizado e cada capítulo exposto com muita autoridade. É recomendado a todos os interessados em biotecnologia de hidrocarbonetos.

Daison Olzany Silva
Deptº de Biologia Geral
Universidade Federal de Viçosa
Campus Universitário
36570 Viçosa MG

Laskin, A.I. & Lechevalier, H.A., eds. - CRC handbook of microbiology. IV - Microbial composition: carbohydrates, lipids and minerals. 2.ed. Florida, CRC Press, 729p., 1982. US\$ 83.00.

O principal objetivo do presente livro é servir como fonte de referência com relação aos componentes das células microbianas, especificamente: carbohidratos, lipídios e minerais. O livro fornece as estruturas, as constantes físicas e as constantes de migração cromatográfica e eletroforética de aldoses, cetonas, açúcares aminados, açúcares ácidos e seus derivados, glicolipídios, ácidos graxos, lipídios complexos e esteróides. São fornecidos, ainda, dados sobre polissacarídios de algas, composição de parede bacteriana e de parede de fungos, dados sobre endotoxinas bacterianas e carboidrases. Em todos os capítulos, há uma preocupação de correlacionar a composição com a taxionomia do organismo do qual os compostos foram isolados. O capítulo "Lipídios na taxionomia bacteriana" não só apresenta tabelas com dados e referências bibliográficas analisa, com propriedade, a participação das variáveis que afetam a composição lipídica dos microrganismos. No tópico que trata dos minerais são apresentados os fatores inorgânicos que participam da atividade enzimática, fornece dados sobre os compostos transportadores de ferro e ainda sobre os citocromos. O livro contém ainda uma secção miscelânea aonde são apresentados os métodos para obtenção de extratos livre de células, para isolamento de parede de fungos e ainda fornece tabelas contendo os diferentes parâmetros físico-químicos sobre a centrifugação diferencial de organelas intracelulares.

Embora os autores procurem dar um número mais abrangente de informações sobre os tópicos abordados, abrangência e a atualidade do livro ficaram sensivelmente prejudicadas pela desatualização da literatura, visto que só excepcionalmente aparecem citações de trabalhos posteriores a 1975. A explicação para este fato talvez esteja que muitas das tabelas apresentadas são cópias daquelas publicações no Handbook of Biochemistry cuja última edição foi em 1975. Além disso, alguns artigos são reproduções ligeiramente modificadas de outros publicados anteriormente pelos mesmos autores. O grande mérito do livro está em agrupar em um único texto, os dados esparsos na literatura, facilitando ao microbiologista o acesso à informações manuseadas normalmente pelos especialistas da área.

Glaci T. Zancan
Deptº de Bioquímica UFPR
Caixa Postal 939
80000 Curitiba PR

UNDP/WORLD BANK/WHO - Quarterly bibliography of major tropical diseases, 5(1):1-83, First quarter, 1982; 5(2):1-96, Second quarter, 1982.

A Organização Mundial da Saúde (WHO), com a co-participação do Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas (UNDP) e do Banco Mundial (World Bank) iniciou um programa global de cooperação técnica internacional, em resposta ao imenso e crescente problema das doenças tropicais e em reconhecimento à necessidade de pesquisas para sanar as dificuldades que impedem o controle dessas doenças.

Este Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (TDR) incluiu em seu contexto a publicação Quarterly bibliography of major tropical diseases, que resulta da colaboração entre a U.S. National Library of Medicine (NLM) e o referido programa finan-

-ciado pelo UNDP/World Bank/WHO. Por meio do Sistema MEDLARS de recuperação e estocagem de informação científica, a NLM proporciona cópias de sua bibliografia computorizada para impressão e distribuição pelo TDR.

Da mesma maneira que o Index Medicus, também produzido pelo mesmo sistema da NLM, esta publicação lista todos os trabalhos por dupla entrada: seção de assuntos e seção de autores. Além disso, muitas das referências citadas são acompanhadas de resumos em língua inglesa (na seção de autores). Os títulos dos artigos são enunciados em inglês e, conforme o caso, em inglês e em sua língua original.

Todas as referências bibliográficas contidas nestas publicações trimestrais relacionam-se às seis doenças tropicais consideradas mais importantes: malária, esquistossomose, filariose, tripanossomiases (doença de Chagas e doença do sono africano), lepra e leishmaniose. Para cada uma delas, na primeira parte das publicações (seção de assuntos), encontra-se detalhadamente especificada a natureza dos temas abordados nos trabalhos, enquanto que na segunda parte (seção de autores) são divulgados os seus resumos.

Nos dois primeiros números de 1982, são observados vários aspectos das doenças tropicais selecionadas. Assim, características básicas (parasitologia, imunologia, microbiologia, patologia, metabolismo, genética, farmacologia, etc), clínicas (diagnóstico, terapêutica, complicações, etc), epidemiológicas ou de prevenção e controle dessas patologias estão contidas nos trabalhos listados.

Pela sua abrangência e praticidade de consulta, esta divulgação bibliográfica pode se constituir em subsídio valioso para os estudos dos processos infecciosos que mais afetam os povos que vivem nas zonas tropicais.

Augusto Cezar Montelli
Deptº de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP

Plant, D.W.; Reimers, N.J. & Zinder, N.D., eds. - Banbury report: patenting of life forms. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 337p., 1982.

O rápido desenvolvimento da biologia molecular, a partir de 1953, causou três grandes impactos sobre a ciência e a sociedade. O primeiro, eminentemente tecnológico, levou à euforia de se situar a biologia como a grande solução dos problemas atuais nas áreas de saúde, energia e agropecuária. O segundo, que se revelou depois altamente inconsistente, foi provocado pelo receio da "criação" de organismos perigosos, capazes de comprometer até a vida sobre a terra. O terceiro, ainda atual, diz respeito aos aspectos legais e morais da manipulação dos seres vivos.

Ultrapassados tanto o grande "boom" do mercado de capitais, como os receios aparentemente infundados do aparecimento de organismos devastadores e incontroláveis, as polêmicas persistem em relação aos aspectos morais e legais da manipulação gênica. Entre esses aspectos, merece destaque o do patenteamento de seres vivos. Tal controvérsia atingiu o seu ápice quando a Suprema Corte dos Estados Unidos da Amé-

rica concedeu a primeira licença de patenteamento sobre um organismo vivo, em 1980, a A. Chakrabarty.

Apoiado no interesse técnico-científico quer do ponto de vista biológico, quer do ponto de vista jurídico e, particularmente, no interesse do público em relação ao assunto, é que P. Sharp, J. Sambrok e J.D. Watson propuseram a V.K. McElheny a organização de um ciclo de debates sobre o assunto.

O encontro foi realizado de 18 a 21 de outubro de 1981, no Banbury Center do Cold Spring Harbor Laboratory, contando com a participação de cientistas, advogados, juízes e representantes de companhias industriais. O livro em pauta resultou do encontro e traz os diversos aspectos abordados no evento, incluindo-se as discussões mantidas durante as sessões.

Estruturalmente, o livro (como o encontro), está dividido em seis partes:

1. tópicos científicos, abordando o aspecto histórico, os anticorpos monoclonais e várias facetas do DNA-recombinante;
2. discussão aberta sobre os tópicos científicos;
3. tópicos legais, com uma visão geral do sistema americano de patentes, comparação com os sistemas europeu e alemão e outros aspectos legais;
4. sistema de patentes da indústria de semicondutores: problemas comuns, particularmente de proteção da patente;
5. discussão aberta sobre os tópicos legais;
6. revisão da lei das patentes e do sistema judiciário e sua adequação ao patenteamento de seres vivos.

Do ponto de vista da biotecnologia, o livro contém uma boa revisão dos aspectos básicos da microbiologia e da biologia molecular relacionados com o DNA-recombinante. Do ponto de vista jurídico, torna-se um documento histórico e técnico do sistema americano e fornece subsídios fundamentais sobre o problema.

A legislação brasileira não prevê o patenteamento de seres vivos. No momento em que vários laboratórios começam a receber forte apoio e aumentam as possibilidades de desenvolvimento de uma tecnologia avançada, "Patenting of life forms" torna-se um documento precioso não só para os biólogos, mas, particularmente, para os responsáveis pela legislação nessa área, como referencial de estudos, visando-se a adequação das nossas leis e a proteção do nosso patrimônio tecnológico.

F. Penalva da Silva
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CNPq/SPI
Av. W3 Norte, Quadra 511
70000 Brasília DF

Quie, P.G. & Kass, E.H., eds. - *The pneumococcus and pneumococcal vaccine*. Chicago, The University of Chicago Press, 1982. US\$ 35.00.

O material que compõe este livro foi publicado originalmente nas "Reviews of infectious diseases", volume 3, número 2 e Suplemento, Março-Abril, em 1981.

Aquela apresentação original correspondeu a dois encontros científicos. De acordo com os editores, desde as publicações devidas a Hefron (1939) e a White (1938) (que coincidiram com o início dos

dramáticos resultados alcançados pela quimioterapia) aos estudos que compendiassem a biologia desses microrganismos, passou-se a atribuir interesse apenas histórico, a despeito de permanecerem ignoradas os mecanismos pelos quais os pneumococos produzem doença, ao lado de que o problema persiste, embora de uma forma menos alarmante. De fato, o tributo que ainda cobram os pneumococos é do conhecimento de todos os neonatalogistas e bacteriologistas clínicos, principalmente quando lidam com as meningites do recém-nato.

A primeira parte do volume em apreciação lida com estudos sobre a pato-biologia do pneumococo e corresponde a um encontro realizado na sede da "Kroc Foundation", na Califórnia. As comunicações cobrem estudos sobre os componentes da superfície do pneumococo, seus bactériofágos, modelos para estudo da resposta imune, epidemiologia da doença e das formas resistentes e antibióticos - que têm sido encontradas em anos recentes - e os mecanismos de agressão e de defesa durante a infecção.

A segunda parte - e a mais extensa da apresentação - detém-se particularmente sobre a vacina para os pneumococos. Corresponde a um encontro realizado em Boston, com o apoio dos "Channing Laboratory", "Harvard Medical School" e "Brigham and Women's Hospital".

No relativo à vacina, o assunto distribui-se em cinco sessões que buscam cobrir os seguintes aspectos: a) desenvolvimento e química da vacina; b) a resposta imune; c) eficácia em diversos grupos etários, particularmente velhos, recém-nascidos e crianças; d) a resposta imune em grupos de pacientes de alto-risco.

Completa-se, finalmente, o livro com a transcrição de um longo artigo de revisão, de agosto de 1927, devido ao próprio Griffith, discutindo o significado dos tipos de pneumococo.

Na relação com os microbiologistas e imunologistas clínicos, os dados sobre o estado presente da vacina e da resistência do pneumococo aos antibióticos são do máximo interesse. Maior interesse ainda possui a publicação para alguns grupos clínicos como "C.T. Istras", neonatalogistas geriatras, infecciólogistas e os que lidam, com alguma frequência com os grupos de pacientes imuno-deprimidos com alto-risco de infecção.

Ítalo Suassuna
 Faculdade de Ciências Médicas
 UERJ - Serviço de Microbiologia
 Rua Prof. Manuel de Abreu, 48
 20550 Rio de Janeiro RJ

Littlefield, L.J. - *Biology of the plant rusts: an introduction*. Iowa, Iowa State University Press, 103p., 1981. US\$ 15.95.

A excelente obra de L. Littlefield "Biology of the plant rusts" deve ser recomendada ou, mais precisamente, não pode ser ignorada por todos aqueles que atuam na área de patologia vegetal, da micologia e, principalmente, por quem se interessa pela ordem Uredinales (ferrugens) dos basidiomicetos.

As ferrugens são responsáveis por algumas das mais devastadoras doenças das plantas cultivadas e consideradas como de distribuição mundial. Nenhum outro tipo de fitopatógenos apresenta, como as ferrugens, a capacidade de afetar um número tão grande de plantas de interesse econômico. Wellman (1972), em seu livro "Tropical American

plant disease - neotropical phytopathology problems", cita mais de 150 espécies de ferrugens como importantes ou potencialmente importantes para a agricultura da América do Sul. Os prejuízos causados por ferrugens às nossas principais culturas econômicas são às vezes, de tal monta, a ponto de prejudicar completamente a produção, ou mesmo impedir o plantio em determinadas épocas do ano. Bastaria citar algumas delas que são uma série e constante ameaça como a ferrugem do café (*Hemileia vastatrix*), do trigo (*Puccinia graminis*) da soja (*Phakopsora pachyrhizi*) do alho e de cebola (*Puccinia alii*), para se ter uma idéia da importância que envolve o problema.

As ferrugens são organismos pleomórficos podendo apresentar vários tipos de estruturas reprodutivas ou esporos com diferentes morfologias e funções, produzidas nos diversos estágios de seus ciclos vitais, por vezes extremamente complicados e confusos. Em virtude de algumas espécies poderem apresentar até 5 tipos de esporos diferentes e duas plantas hospedeiras não relacionadas entre si, as ferrugens estão entre os microrganismos de ciclos biológicos mais complexos, sendo muitas vezes extremamente difícil comprovar as conexões existentes entre os estados denominados imperfeitos (anamorfos) e os perfeitos. (teliomorfos).

Mesmo em se tratando de organismos tão complicados, em apenas 103 páginas, Littlefield consegue, com uma notável capacidade de síntese, cobrir toda a área e reunir o que há de essencial para a melhor compreensão desse importante e complexo grupo de fungos fitopatogênicos, nos seus mais variados aspectos. A obra focaliza desde a importância econômica e distribuição geográfica das ferrugens até algumas idéias básicas sobre os principais métodos de controle comumente aplicados. Traz noções fundamentais sobre os ciclos vitais, estados esporíferos, nomenclatura, terminologia, taxonomia, relações patógeno-hospedeiro e algumas informações sobre os progressos havidos nos cultivos "in vitro" de algumas espécies. Esse livro vem cobrir uma lacuna existente há muitos anos, pois a única obra anterior, abrangendo de uma forma mais ampla os conceitos gerais sobre os Uredinales, era "The plant rusts" de autoria de J.C. Arthur, datada de 1929. "Biology of the plant rusts" é uma obra moderna, atualizada e ricamente documentada com fotos em branco e preto e a cores, sobre os sintomas e sinais de doenças causadas por ferrugens e magníficas fotos dos principais aspectos morfológicos das estruturas esporíferas e esporos a nível da microscopia de varredura.

Mário Barreto Figueiredo
Seção de Micologia Fitopatológico
- Instituto Biológico
Caixa Postal 7119
01000 São Paulo SP

União dos Defensores da Terra - Carta de apresentação: Oikos. São Paulo, 1981.

Palavra grega "Oikos" significa casa e foi empregada pela primeira vez por Ernst Haeckel, em 1866, associada ao sufixo logos "Oekologie", para definir a ciência que estuda as relações entre os organismos vivos e seu meio ambiente. Dez anos após 113 nações terem adotado, em junho de 1972, o lema-compromisso "Uma só Terra", durante a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Humano, surge Oikos - União dos Defensores da Terra, entidade não governamental, independente, apartidária, aberta, que congrega: pesquisadores científicos, profissio-

nais liberais, empresários, universitários e os segmentos sociais mais atingidos pela degradação ambiental e sanitária: operários, camponeses, crianças, velhos e enfermos.

Oikos é associada à SBPC e entre seus membros figuram os conservacionistas de quase todas as entidades ambientalistas.

A criação da Oikos foi determinada pela urgência de uma ação conjunta, eficiente e independente visando colocar em xeque a política ambiental brasileira vigente e denunciar todos os crimes contra a natureza e desastres ambientais pois estes, em última análise, irão atuar sobre a integridade física do próprio homem.

Oikos propõe-se à tarefa de coordenar a resistência conservacionista nacional e auxiliar (proporíamos que o termo fosse estimular ou exigir) a comunidade científica a assumir a responsabilidade de reordenar e intervir no modelo de desenvolvimento nacional.

Oikos propõe-se a divulgar relatórios e documentos elaborados por colaboradores e consultores, e a denunciar nacional e internacionalmente todas as agressões aos princípios adotados em Estocolmo, pela ONU, e acionará judicialmente os responsáveis pelos desastres ecológicos ou crimes contra a qualidade de vida e promete lutar pelo direito de aspirar à equidade, segurança e acesso a alimentos sadios e ao consumo dentro dos padrões nacionais onde a ética da sobriedade deva substituir os vícios do consumismo e as tecnologias brandas e inteligentes possam substituir os atuais processos industriais poluidores.

Oikos denuncia a diminuição de nossas florestas já exígias, a liquidação indiscriminada dos estoques de minerais estratégicos e a extinção de espécies vegetais e animais que ocorre a cada dia, prevendo que se for mantido o ritmo da devastação crescente chegaremos ao ano 2000, com um milhão a menos de espécies quando possuímos estoque de cinco a dez milhões de formas distintas de vida animal ou vegetal e ainda, que: o patrimônio natural que cada geração tem o dever de levar às seguintes intactos ou enriquecido deteriora-se a olhos vistos.

Oikos levanta o problema mundial dos 500 milhões de subnutridos em grau extremo e dos 800 milhões que vivem miseravelmente e de 1,2 bilhões de pessoas que não dispõem de água potável ou saneamento.

Oikos discute que a ciência é uma função de vida e que se justifica apenas quando à serviço da sobrevivência humana e propõe ainda que a Ecologia Pluridisciplinar, ciência de economia doméstica, planetária, é a única capaz de avaliar a potencialidade dos três quartos do estoque genético mundial localizado no território nacional, colocando-os racionalmente a serviço da comunidade carente.

Oikos se propõe a estimular o debate na sociedade, multiplicando os grupos de pressão ou expressão das maiorias silenciosas e/ou silenciadas e para isto apela para a Declaração Universal dos Direitos Humanos. Reclama uma cooperação universal para a edificação dos fundamentos da nova sociedade a ser construída sob a égide de uma ética mais decente, solidária e universalizante para uma política de administração ambiental e social amparada na justiça e fraternidade.

Oikos reinvindica uma reformulação do PNUMA (Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente) e um aumento de sua dotação orçamentária nas mesmas proporções que o PNUD (Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento).

A Oikos entende que o desenvolvimento sustentável é baseado no sólido terreno da eqüidade, valorização dos recursos nativos e da plena utilização do capital humano, sob o consenso de que o desenvolvimento

econômico-financeiro e conservação ambiental são o verso e reverso da mesma moeda.

Oikos propõe-se a analisar os entraves que enfrentaram as entidades e esforços ambientalistas entre 1972 e 1982 e daí extrair novas lições imprescindíveis ao êxito da tarefa a que se propõe realizar, e inicia sua atuação inteiramente aberta e receptiva a novas idéias, aspirações e associados simpatizantes de seus compromissos.

Os microbiologistas congratulam-se com este movimento lembrando que vários especialistas deveriam atuar no processo, no âmbito da Microbiologia Agrícola, de Alimentos, Ambiental, Básica, Industrial, Médica Humana e Médica Veterinária.

Finalmente, o cientista sai da alienação de sua redoma de cristal e se conscientiza de que a "ciência é uma função da vida, justificando-se apenas enquanto a serviço da sobrevivência humana, divorciada da qual perderá todo sentido e razão de ser".

Isto é extremamente importante; é preciso conscientizar o engenheiro de que ele não deve pensar que poderá dominar a natureza; ao arquiteto, de que deverá respeitar a paisagem e integrar o projeto arquitetônico ao meio e não este ao projeto, evitando construções de selvas de pedra; ao químico, de que ele deverá procurar processos e tecnologias mais brandas e menos poluidoras; aos biólogos, de que já está passando a hora de catalogar nossa flora e fauna, de estudar suas funções, pois é incrível que se estime que temos um estoque de cinco a dez milhões de formas distintas de vida animal ou vegetal quando as mesmas não estão completamente catalogadas e poucos grupos existentes no país se dedicam a esta tarefa, havendo tantas lacunas, que muitas vezes temos que recorrer a especialistas do exterior para classificar nossas espécies nativas.

Quando ocorrem desastres ecológicos, torna-se impossível quantificar os danos, pois, não se têm dados básicos sobre os ecossistemas do local.

As entidades de controle ambiental têm que enviar seus profissionais para treinamento no exterior ou trazer especialistas alienígenas, pois, contamos, em nosso país, com raríssimos especialistas e muitos deles não dão o apoio necessário às Instituições.

Muitas vezes nossas Instituições de controle ambiental têm maiores conhecimentos que a Universidade e, com raras exceções, os poucos "experts" das Universidades só se propõem a prestar auxílio quando contratados como consultores. Até hoje os professores das Universidades não se importaram em atualizar os cursos em metodologia ambiental. Em muitas reuniões, a que estivemos presentes, têm mostrado repulsa a vários estudos, interrogando muitas vezes seus ex-alunos, se estão fazendo pesquisa ou "rotina" que é a denominação que dão à tecnologia. Nenhum dos profissionais, procedentes de Universidades chegam habilitados a exercer suas funções às Instituições de controle ambiental, onde precisam receber treinamento "em bancada" ou seguir para aperfeiçoamento no exterior.

É importante lembrar que o controle e preservação ambiental devem ser feitos por equipes multidisciplinares, compostas de biólogos, engenheiros, ecólogos, geólogos, geógrafos, engenheiros em várias especialidades, geneticistas, químicos, microbiologistas, toxicologistas, administradores, médicos em várias especialidades, bioquímicos, economistas, sociólogos, antropólogos, advogados, etc. Para isto é necessário o estabelecimento de uma linguagem, para que a Oikos possa desenvolver seus trabalhos nesta área. Que a Oikos promova a criação de currículos sobre gestão ambiental, avaliação de impactos ambien-

tais, propondo metodologia eficaz, mais econômica e menos sofisticada, novos métodos de disposição de resíduos, processos de disposição de resíduos, processos de tratamento de efluentes industriais ou municipais, adequados à realidade nacional.

Que em todos os cursos profissionalizantes e técnicos sejam incluídos conceitos básicos de ecologia; que os políticos sejam assessorados por profissionais de reconhecida capacidade na área. Que o carreirismo seja evitado e que a honestidade seja o princípio básico para a tomada de todas as decisões. E que a Oikos não seja apenas mais uma associação; mas que efetivamente atinja suas metas é o que desejamos ansiosamente. Que possa estimular a Universidade para ser mais atuante na organização de cursos de especialização, graduação ou pós-graduação, seminários e simpósio sobre o tema: que lidere a formação de pessoal nestas áreas e que preencha as lacunas necessárias na área de pesquisa básica e na pesquisa aplicada.

Que a luta da Oikos leve ao aumento de dotação orçamentária às Universidades, para que isto se torne realidade e que todos tenham em mente que controle de poluição não é apenas o diagnóstico da situação, isto é, a detecção do problema; mas e, principalmente, a tomada de medidas preventivas e corretivas acessíveis à nossa realidade, a avaliação e o acompanhamento das medidas implantadas.

Oikos - União dos Defensores da Terra, Caixa Postal 51570, 01000 São Paulo, SP.

Maria Therezinha Martins
Cetesb
Av. Prof. Frederico Hermann Jr.,
345
05459 São Paulo SP

Michal, F., ed. - Proceedings of a Symposium of Modern Genetic Concepts and Techniques in the Study of Parasites, Geneva, Switzerland, 25-29 May, 1980. Geneva, UNDP/WORLD BANK/WHO, Tropical Diseases Research Series, 4, 430p., 1981.

Baseado em conferências proferidas em um simpósio organizado pelo grupo de trabalho em ciências biomédicas da OMS, este livro é praticamente único na extensão da temática abordada. Em outras palavras, trata-se de um livro onde a parasitologia molecular é muito bem equilibrada em suas partes parasitológica e molecular, sendo extremamente útil para parasitologistas e biólogos moleculares que estejam trabalhando, ou queiram reciclar-se, no campo recente da parasitologia molecular.

O livro editado por Frank Michal é dividido em quatro partes distintas, sendo a última delas discussão geral.

A primeira parte do livro apresenta artigos de base relacionados aos fundamentos da biologia molecular moderna, a saber: "Estrutura de cromatina" (J. Thomas); "Organização do genoma de eucariotos" (B. Mach) e "Mecanismos moleculares de diferenciação" (M. Crippa). Temas mais específicos como os "Aspectos moleculares da diversidade de anticorpos" (A.R. Williamson), "O sistema HLA de histocompatibilidade" (J. Van Rood) e "O papel biológico de DNA extracromossomal" (C. Morel e L. Simpson) são também apresentados. Ainda relacionado aos fundamentos da biologia molecular, encontra-se uma revisão de S. Falkow sobre "Plasmídeos, transposons e clonagem molecular de genes", sendo

enfatizada a perspectiva da fabricação de vacinas contra diferentes parasitos causadores de doenças.

Na segunda parte são apresentados artigos de ligação entre a parasitologia e a biologia molecular, centrados, basicamente, na genética de parasitos e em aspectos imunogenéticos da infecção parasitária. Como salientado por Dr. Wallinker, o estudo da genética de parasitos torna-se difícil em grande escala devido ao fato dos mesmos apresentarem um ciclo de vida complexo. Entretanto, espera-se que, com a aplicação de técnicas de genética molecular, os estudos até então centrados nos parasitos da malária ou em alguns helmintos, possam ser estendidos a outros parasitos. Assim a genética molecular tem sido utilizada com bastante êxito nos estudos da variação antigênica de tripanosomas africanos (G. Cross) ou ainda, nas infecções por toxoplasma (E.R. Pfefferkorn) graças à facilidade de poder-se trabalhar com células infectadas em cultura.

Aspectos mais específicos de doenças provocadas por parasitos são discutidas na terceira parte do livro. São apresentados artigos sobre os aspectos genéticos da malária (R. Nussensweig), da esquistossomose (A.F. Mahmoud), da filariose (L.G. Goodwin), da lepra (M. Harboe) e das tripanosomiases africanas (B.A. Newton). Neste último caso é descrito o cultivo "in vitro" de tripanosomas em diferentes estágios de diferenciação. Ainda nesta mesma seção, são apresentados dois trabalhos sobre doenças causadas por tripanosomatídeos: a Doença de Chagas é extensivamente revisada por Z. Brener do Centro de Pesquisas René Rachou enquanto C.L. Greenblatt discute a especificidade da interação hospedeiro-parasita em Leishmaniose.

O livro é encerrado com uma discussão geral onde as preocupações são centradas em três pontos principais:

- a necessidade de isolar-se抗ígenos que permitam a obtenção de vacinas, como por exemplo, no caso da malária onde R. Nussensweig da Universidade de Nova Iorque descreve a obtenção de um anticorpo monoclonal conferindo proteção contra o plasmódio;
- a necessidade de estabelecer-se métodos simples e eficientes (para uso no campo) que permitam a detecção da infecção parasitária precocemente. Neste aspecto, torna-se extremamente relevante a técnica desenvolvida por C. Morel da Fiocruz e L. Simpson da Universidade da Califórnia, permitindo a identificação e classificação de tripanosomatídeos, através do padrão de digestão do DNA de cinetoplasto por enzimas de restrição;
- um melhor intercâmbio e uma colaboração mais próxima entre parasitologistas e biólogos moleculares.

Em suma, este livro de 430 páginas, e de leitura fácil e agradável, apresenta-se de grande utilidade para pesquisadores e estudantes que trabalhem ou queiram aprofundar-se no campo da parasitologia molecular.

Samuel Goldenberg
Deptº de Bioquímica e Biologia
Molecular
Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365
21040 Rio de Janeiro RJ

ERRATA

Onde se lê:

Tabela 8 - Número Mais Provável (NMP) de bactérias do grupo butírico durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Número Mais Provável (NMP) por ml de salmoura			
	Fermentações			
	1	2	3	4
0	>2400	1100	27	20
7	>2400	75	<3	<3
14	6,1	3	<3	<3
21	<3	4	<3	<3
28	93	400	<3	<3
35	7,3	>240	23	<3
42	460	3,6	23	<3
49	3	23	9,1	<3

Leia-se:

Artigo "Estudo microbiológico da produção de chucrute com repolho 'Matsukase' (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.) Rev. Microbiol., 13(4):433-439, Out./Dez. 1982.

Tabela 8 - Número Mais Provável (NMP) de bactérias do grupo butírico durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Número Mais Provável (NMP) por ml de salmoura			
	Fermentações			
	1	2	3	4
0	11	1100	9	460
7	20	93	36	<3
14	93	14	<3	<3
21	<3	<3	<3	<3
28	<3	<3	<3	<3
35	9,1	<3	<3	<3
42	9,1	<3	<3	<3
49	12	3,6	<3	<3

Tabela 9 - Número Mais Provável (NMP) de bactérias halofílicas durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Modelo	Número	%
CeHSu	1	5,0
CeHCa	3	15,0
HCa	2	10,0
CeH	8	40,0
Ca	2	10,0
Ce	2	10,0
H	2	10,0
Sensibilidade a todas as drogas	0	-

Tabela 9 - Número Mais Provável (NMP) de bactérias halofílicas durante a fermentação lática do repolho cultivar 'Matsukase'

Dias de fermentação	Número Mais Provável (NMP) por ml de salmoura			
	Fermentações			
	1	2	3	4
0	>2400	1100	27	20
7	>2400	75	<3	<3
14	6,1	3	<3	<3
21	<3	4	<3	<3
28	93	400	<3	<3
35	7,3	>240	23	<3
42	460	3,6	23	<3
49	3	23	9,1	<3

Folhetos e Impressão



Avenida Bogart, 64
Vila das Mercês São Paulo
Fones: 63-2188 63-2378
274-5563 274-1551 272-3507

