

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 14 Número 2 Abr.-Jun. 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 milímicro ($m\mu$) micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6}m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9}m$), ao invés de milímicro ($m\mu$); e Angstroms (\AA ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido 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 da 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 brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

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: 2 ORTN's 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, 1374
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 06459 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

A Sociedade Brasileira de Microbiologia recomenda que seus associados prestigiem os sócios patrocinadores da Revista de Microbiologia:

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares
Eli Lilly do Brasil Ltda.

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
Depto. de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.icb.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 14 ABRIL-JUNHO 1983 NÚMERO 2
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 14(2)

CONTEÚDO

CONTENTS

Helga V.L. Maffei	67	Mecanismos de defesa anti-infecciosa em nível de mucosa intestinal	<i>Anti-infectious defense mechanisms at the intestinal mucosa level</i>
Carlos Augusto M. Ferraz & Eugênio Aquarone	78	Influência do acetato de sódio na produção celular de lipídios e no "up take" de Mn e Fe de <i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Influence of the sodium acetate on the production of cellular lipids and uptake of Mn and Fe in <i>Chlorella vulgaris</i></i>
Ivanhoé R. Baracho & Sonia F.A. Pereira	84	Utilização da luz ultra-violeta no melhoramento de <i>Aspergillus niger</i> para produção de ácido cítrico	<i>Utilization of ultraviolet light in the improvement of <i>Aspergillus niger</i> for citric acid production</i>
Maria Regina Branquinho Celuta Sales Alviano & Ilvan D. Ricciardi	90	Determinação da composição química e ação biológica do lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Campylobacter fetus</i> ss. <i>jejuni</i>	<i>Chemical composition and biological action of lipopolysaccharide (LPS) of <i>Campylobacter fetus</i> ss. <i>jejuni</i></i>
Luiz Carlos D. Formiga Leila Maria M. Vieira Tania L. de Assis & Italo Suassuna	97	Estudo do agente etiológico do "eritrasma". I - Caracterização dos difteróides fluorescentes	<i>Studies on the causative organism of "erythrasma". I - The characterization of fluorescent diphtheroids</i>
Luiz Carlos D. Formiga Teresa Cristina M. Malburg Carmem Alexandrina M. Silva Arnaldo de F.B. Andrade & Italo Suassuna	106	Estudo sobre o agente etiológico do "eritrasma". II - Reações sorológicas com o gênero <i>Corynebacterium</i>	<i>Studies on the causative organism of erythrasma. II - Serological relationships within the genus <i>Corynebacterium</i></i>
Carlos H. Romero Geraldo B. Cruz Cheryl A. Rowe & Eline M.R. Carvalho	109	Transmissão do vírus da leucemia bovina através da ingestão de leite	<i>Transmission of bovine leukemia virus through milk ingestion</i>
Anita Ivoni C. Monteiro	115	Poliomielite no Rio Grande do Sul e Paraná: isolamento de poliovírus nos anos de 1979 e 1980	<i>Poliomyelitis in Rio Grande do Sul and Paraná States: virus isolation in 1979 and 1980</i>

Geraldo A. de Carli	122	Comparação antigênica entre <i>Tritrichomonas suis</i> , <i>T. foetus</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> e <i>T. gallinae</i> pela imunodifusão em gel	<i>Antigenic comparison between Tritrichomonas suis, T. foetus, Trichomonas vaginalis and T. gallinae by gel immunodiffusion</i>
Edvaldo Carlos B. Loureiro Marlene B. Serafim Alexandre da C. Linhares & Antonio F.P. Castro	129	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas e rotavírus detectados em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from children with acute gastroenteritis, Belém, Para</i>
Claudete R. de Paula Adhemar Purchio & Walderez Gambale	136	Leveduras isoladas de praias da região sul do Estado de São Paulo, Brasil	<i>Yeasts from beaches in the Southern area of São Paulo State "Baixada Santista", Brazil</i>
Márcia Giambiagi Alba Lúcia S. Noleto & Elisa G.C. Penido	144	Triagem da resistência e de fatores de virulência em <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>A screening of resistance and virulence factors in Staphylococcus aureus</i>
Informação Técnico-Científica SBM	150		

MECANISMOS DE DEFESA ANTI-INFECCIOSA EM NÍVEL DE MUCOSA INTESTINAL

Helga Verena Leoni Maffei

Deptº de Pediatria
Faculdade de Medicina de Botucatu
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP, Brasil

Resumo

Foram analisados os mecanismos extrínsecos: leite materno, e intrínsecos envolvidos na defesa anti-infecciosa intestinal. Os mecanismos intrínsecos inespecíficos (acidez gástrica, peristaltismo intestinal, etc.) foram rapidamente abordados e a ênfase da revisão foi sobre os mecanismos de defesa imunológica específicos: a) na mucosa intestinal os plasmócitos da lâmina própria e o sistema secretor levando à secreção de imunoglobulinas para a luz intestinal, representam o sistema imune humoral; b) os linfócitos intraepiteliais, as células T "helper" e os linfócitos T da lâmina própria representam o sistema imune celular. Analisou-se como fatores como a baixa idade e desnutrição proteico-energética influenciam estes mecanismos imunológicos e discutiu-se os mecanismos que possivelmente regulam o equilíbrio entre o hospedeiro e sua flora autóctone.

Summary

Anti-infectious defense mechanisms at the intestinal mucosa level

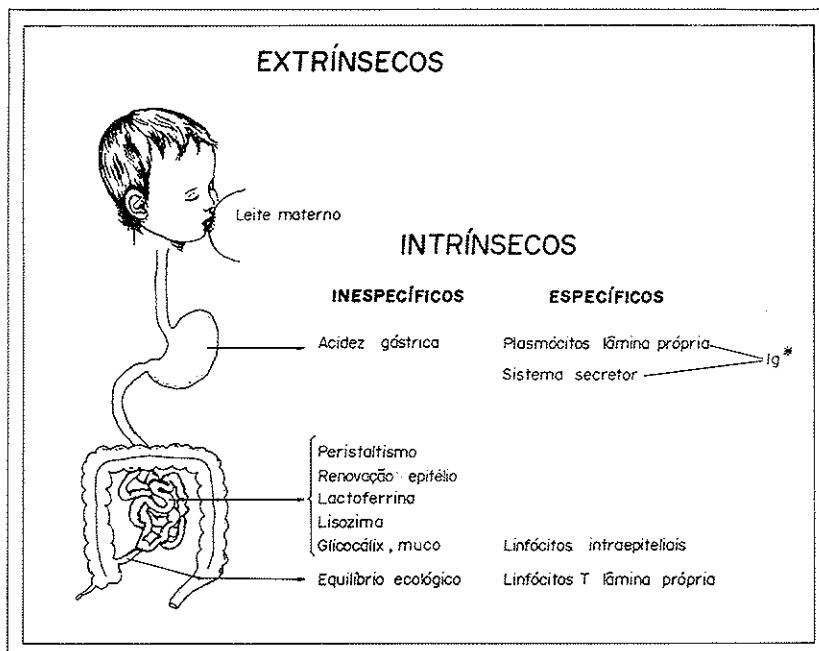
The extrinsic (breast milk) and intrinsic mechanisms involved in the intestinal anti-infectious defenses were analysed. The nonspecific intrinsic mechanisms, like gastric acidity and intestinal peristaltism, were rapidly approached and the emphasis of this review was laid on the specific immunological defense mechanisms: a) in the intestinal mucosa the plasmocytes and the secretory system are responsible for the secretion of immunoglobulins into the intestinal lumen and represent the humoral immunity; b) the intraepithelial lymphocytes, the T helper cells and the T lymphocytes of the lamina propria represent the cellular immune system. Factors as low age and protein energy malnutrition were analysed as to their influence upon these immunological mechanisms and the equilibrium between the host and his indigenous flora was discussed.

Introdução

Mecanismos de defesa anti-infecciosa a nível de mucosa intestinal - Diversos mecanismos estão envolvidos na defesa contra o meio externo contaminado que constantemente entra em contato com a mucosa do aparelho digestivo (Fig. 1). Na fase inicial

da vida, é relativamente escasso o tecido linfóide intestinal mas são inúmeros os estímulos antigênicos novos, tanto os da flora normal ou patogênica, como os derivados da ingestão de proteínas estranhas. Nesta fase, portanto, o aleitamento materno é extremamente importante pois contribui com valiosos elementos de defesa (imunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, linfócitos, macrófagos, neutrófilos) (33), mas após este período o organismo tem que estar preparado pois passa a depender exclusivamente de seus próprios mecanismos de defesa.

Figura 1 - Mecanismos de defesa anti-infecciosa no trato gastrointestinal



* Ig = Imunoglobulinas.

Mecanismos de defesa inespecíficos - A acidez gástrica é a primeira barreira encontrada pelos microrganismos ingeridos, pois é bacteriostática ou bactericida conforme os níveis de concentração hidrogeniônica alcançados (23). Cabe lembrar, no entanto que a acidez gástrica se encontra diminuída em parte das crianças com DPC (23). Os microrganismos que conseguirem ultrapassar a barreira gástrica ácida vão ser clareados pelo peristaltismo normal a nível de delgado, clareamento este que está prejudicado em situações de estase. A diarréia constitui-se em importante fator de clareamento dos enteropatogênicos através deste mecanismo, razão pela qual, em vigência de diarréia estão contra-indicadas drogas que diminuem o peristaltismo intestinal. Também a continua renovação das células epiteliais ajuda a eliminar as toxinas ou microrganismos nelas aderidos ou existentes intracelularmente. Este processo de descamação celular encontra-se acelerado em algumas patologias, por exemplo na infecção pelo rotavírus (16).

A lactoferrina e a lisozima, substâncias existentes na maior parte das secreções externas, agem quer através de atividade bacteriolítica (lisozima), quer impedindo a utilização de ferro pelas bactérias (lactoferrina), já que o ferro é elemento es-

sencial para o desenvolvimento bacteriano (27).

O muco e o glicocalix que recobrem as vilosidades e microvilosidades intestinais, embora ainda tenham sido pouco estudados sob este aspecto, provavelmente também são importantes como barreira à aproximação dos microrganismos à célula intestinal. Neste sentido merece ser ressaltado que as mucinases do vibrião colérico talvez sejam necessárias para a penetração da bactéria no muco intestinal (17), a reação antígeno-anticorpo parece estimular a secreção de muco que ajudaria a reter os microrganismos (46) e grande parte da imunoglobulina A (IgA) secretada para o lumen parece ficar retida no muco próximo às vilosidades intestinais (10, 35).

Mecanismo de defesa importante é o equilíbrio ecológico da flora microbiana intestinal autóctone. Sua destruição pela antibioticoterapia, além de facilitar a instalação de enteropatógenos (45) permite o crescimento do anaeróbio *Clostridium difficile* cuja toxina vem sendo responsabilizada por grande parte das colites pseudomembranosas (36).

Mecanismos de defesa imunológica específicos - O grande número de revisões recentes sobre o assunto demonstra claramente a importância que os mecanismos de defesa imunológica a nível de mucosa intestinal vem adquirindo ultimamente (4, 8, 10, 12, 18, 21, 29, 43). No entanto, já nas primeiras décadas do século começou-se a relacionar a resposta imune, decorrente de infecções entéricas, com eventos a nível intestinal e não apenas em sangue periférico, como atestam trabalhos da época citados por Clancy & Bienenstock (10): Davies, em 1922, detectou coproanticorpos em pacientes com disenteria bacilar antes que anticorpos séricos; em 1927, Besredka observando resistência à infecção após vacinação oral, não relacionada com anticorpos circulantes, afirmou: "O plano para vacinação artificial deve ser o de seguir a rota que o vírus toma quando penetra no organismo".

Estes e estudos subsequentes tomaram novo impulso em 1965 com a caracterização por Tomasi & col. da principal imunoglobulina (Ig) existente nas secreções, a IgA, como sendo diferente, sob alguns aspectos químicos e imunológicos, daquela existente no soro (44). Entre outras diferenças, no homem predomina a forma monomérica de IgA no soro, ao passo que nas secreções ocorre essencialmente a forma dimérica. Também do ponto de vista quantitativo o compartimento imune intestinal não é um simples reflexo do que acontece no compartimento vascular, como fica evidenciado quando se observa a diferente distribuição das Ig nas secreções externas e internas do organismo; enquanto no soro a Ig predominante é a IgG, na mucosa intestinal proximal de adultos aproximadamente 80% dos plasmócitos produzem IgA, 16% IgM e apenas 3% IgG, cabendo parcelas ínfimas à IgE e IgD (4). Também nas secreções intestinais a Ig predominante é a IgA. Apesar do nítido predomínio de IgA nas secreções, a resposta primária aos estímulos抗原icos no entanto, parece ser essencialmente com produção de IgM, tanto em animais como em seres humanos (30, 34), seguida secundariamente, nas secreções, da produção de IgA secretora (IgA_s).

Existem na mucosa intestinal células derivadas de linfócitos B relacionadas com a imunidade humoral e que são os plasmócitos produtores de imunoglobulinas, e linfócitos T relacionados com a imunidade celular. Grande parte dos linfócitos intraepiteliais (LIE) existentes no epitélio intestinal correspondem à linfócitos T (Fig. 2).

Imunoglobulinas - Estudos feitos em adultos indicam que existem aproximadamente 1010 plasmócitos produtores de IgA por metro linear de intestino (4). A maneira como os plasmócitos povoam a mucosa intestinal tem sido bastante estudada e pode ser resumida como se observa na Figura 3. O antígeno, alimentar ou infecioso, existente na luz intestinal é "captado" por células especializadas - denominadas células M - existentes na superfície das placas de Peyer (32). Estas células, assim denominadas por apresentarem microdobras, apresentam um epitélio muito adelgado, que permite fácil contato dos linfócitos e macrófagos com os抗原os luminares. O antígeno "captado" vai estimular principalmente linfócitos B que, passando pelos nódulos linfáticos mesentéricos e ducto torácico, vão cair na circulação sistêmica e ser redistribuídos para a lámina própria da mucosa intestinal, glândula mamária, salivar, lacrimal, possivelmente brônquios e talvez até do aparelho gênito-urinário, onde estas células B precursoras se transformarão em plasmócitos produtores de

Ig, principalmente IgA (43). O circuito entero-mamário, isto é, a estimulação anti-gênica no trato intestinal materno com produção de anticorpos na glândula mamária é de capital importância na real e potencial proteção do neonato. O leite materno vai refletir experiência antigênica da mãe e a imunização oral de fêmeas prenhas tem sido utilizada para prevenir doença diarréica nos filhotes amamentados (1, 21, 43).

O estímulo antigênico local, a nível de mucosa intestinal parece importante para que a lâmina própria seja povoada de plasmócitos: assim é que a densidade de plasmócitos é maior no local da estimulação antigênica (31). Aparentemente as células B precursoras dos plasmócitos povoariam todo o intestino mas, não havendo estímulo antigênico local, teriam presença transitória apenas, ao passo que na presença do estímulo local haveria multiplicação celular e/ou atração de novas células precursoras. Neste sentido, cabe ressaltar que os imunócitos predominam na região mais vulnerável do intestino e com maior carga antigênica alimentar, isto é, na região proximal, e não na região com a maior carga bacteriana habitual, íleo terminal e cólon (35).

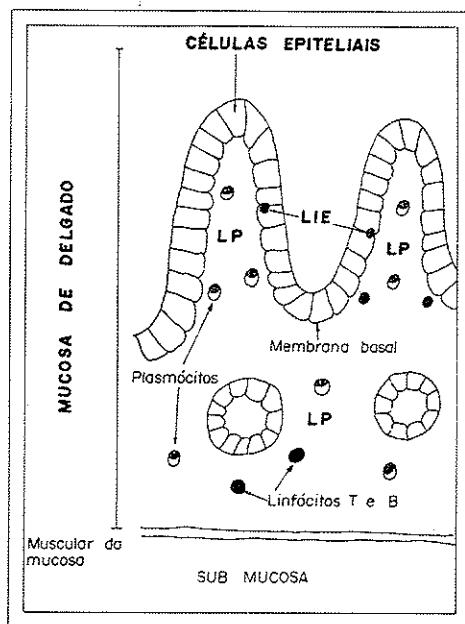
Os plasmócitos da lâmina própria intestinal sintetizam, além das Ig, o polipeptídeo denominado cadeia J, que se liga às Ig formando os dímeros de IgA e pentâmeros de IgM. A cadeia J parece ser essencial para o processo de secreção das Ig, pois funciona como elemento específico de ligação com o componente secretor (CS), que é uma glicoproteína sintetizada pela célula epitelial e que tem sido postulado ser o receptor da célula epitelial para as Ig. Ao que tudo indica as Ig são a seguir secretadas pela célula epitelial para o lumen por um processo de pinocitose reversa. Também o CS é fundamental no processo secretório, pois não ocorre secreção na sua ausência ou na presença de anticorpo anti-CS (5, 9). Por outro lado, sua presença confere à IgAs maior resistência à ação proteolítica das enzimas digestivas. Segundo as evidências existentes a IgAs é mais estável na luz intestinal do que a IgMs, e por outro lado, parece ficar englobada no muco que recobre as vilosidades intestinais (10, 35) (Fig. 4).

Até hoje não se conhece nenhum mecanismo de secreção das outras Ig, portanto assume-se que quando detectadas nas secreções tenha ocorrido transudação vascular (8). Na vigência de inflamação na mucosa intestinal pode ocorrer transudação das Ig séricas para a luz intestinal decorrente de maior permeabilidade capilar.

Merce ser lembrado que parte das IgAs existentes na luz do delgado provém da secreção biliar. No entanto, ainda não está esclarecido como se faz esta secreção para a bile no homem, se a IgA é retirada do plasma ou se é sintetizada no próprio hepatócito (29).

O mesmo circuito descrito para que a lâmina própria seja povoada por plasmócitos também parece ser percorrido por células T que mediariam as reações de hipersensibilidade tardia a nível de mucosa e presumivelmente por uma subpopulação de células T, que seriam as células T "helper" (43).

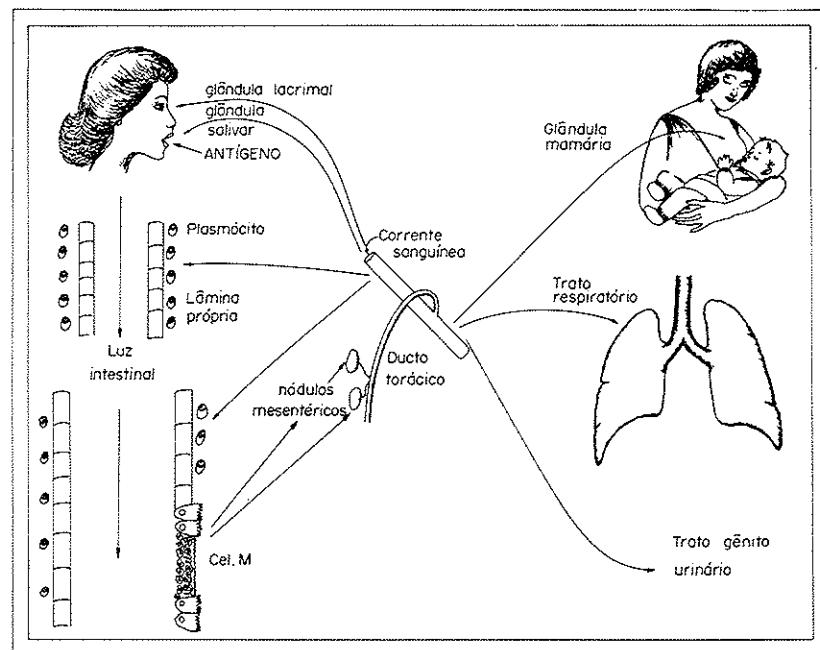
Figura 2 - Células imunocompetentes na mucosa de intestino delgado



LP = lâmina própria; LIE = linfócitos intraepiteliais.

Mecanismos de atuação das imunoglobulinas - Sabe-se atualmente que a imunização natural ou artificial por via oral é essencial para que haja proteção local através da produção de imunoglobulinas secretoras, na maior parte das situações. Embora a imunização oral possa induzir também à produção de anticorpos circulantes, a imunização parenteral raramente leva à proteção a nível de mucosas.

Figura 3 - Trânsito das células imunológicas após estímulo抗原ico



Só serão analisados a seguir os possíveis mecanismos de atuação das imunoglobulinas secretórias na luz intestinal contra microrganismos, não tendo sido considerados os mecanismos de exclusão de抗原os alimentares.

As adesinas, isto é, os抗原os de superfície filamentosos de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC) (抗原os K88, K99), quando dadas por via oral a animais induzem à formação de anti-adesinas e protegem contra a doença causada por estes enteropatógenos (18, 35). Pode também ocorrer a produção de anticorpos antitoxina, quer frente à doença natural por gérmenes enterotoxigênicos, quer frente à imunização por via oral com a sub-unidade B ("binding") da toxina colérica ou da toxina termo-lábil das ETEC. Este tipo de anticorpo não foi obtido, no entanto, para a toxina termo-estável das ETEC uma vez que esta toxina, em seu estado natural não é imunogênica (38). Outro possível mecanismo de atuação, observado experimentalmente, é o da eventual modificação da composição抗igenica dos enteropatógenos, pois porcos jovens imunizados oralmente com抗igenos O de *Escherichia coli* e a seguir infectados com cepas contendo o抗igeno K88 passaram a excretar cepas K88 negativas que tinham perdido sua enteropatogenicidade (35). A produção de Ig secretoras pode ser estimulada pelos lipopolissacarídeos da parede celular dos organismos Gram-negativos, já que este componente bacteriano existe livre na luz intestinal e é um potente mitógeno B, promovendo a síntese preferencial de IgM (35). As Ig podem propiciar a aglutinação bacteriana (28) na luz intestinal e bacteriostase, facilitando a eliminação bacteriana pelo peristaltismo intestinal. Recentemente foi sug-

rido que a ligação IgAs à superfície de *Salmonella typhimurium* tenha efeitos hidrofílico e de alteração de carga iônica do microrganismo e que seriam estes os fenômenos que ajudariam a excluir o antígeno da superfície mucosa (25).

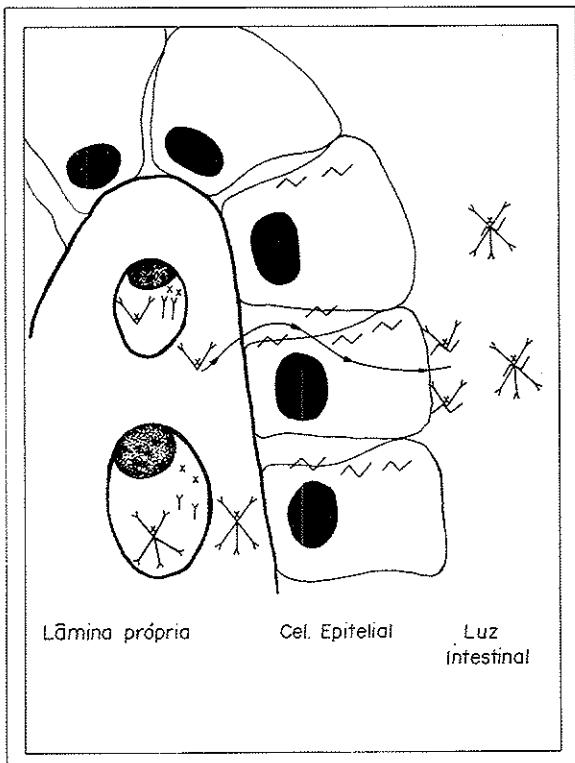
Como se verifica, as diversas maneiras de atuação das Ig secretoras levam à imunoexclusão mas não à desnutrição do agente infectante. No entanto, os agentes agressores que escaparem desta primeira linha de defesa e penetrarem na célula intestinal encontrarão nova barreira de IgA, IgM e IgG, as duas últimas capazes de ativarem complemento e a IgG também relacionada com a citotoxicidade mediada por células e anticorpo-dependente (5). Portanto, no meio contaminado que é a luz intestinal há a imunoexclusão (assepsia), ao passo que no meio estéril, que é a célula intestinal, existe o potencial para a destruição do microrganismo (antisepsia), com concomitante lesão da célula epitelial. Havia lesão epitelial importante haverá diminuição na produção do CS, o que passa a ser um fator limitante na secreção de Ig, mesmo que os plasmócitos produtores de Ig não estejam alterados.

Linfócitos intraepiteliais (LIE) - Os LIE ocorrem na região basal do epitélio, entre as células epiteliais da mucosa intestinal, portanto são intercelulares e intraepiteliais (Fig. 5). Excepcionalmente são vistos próximos à ou na luz intestinal onde, quando encontrados, são inativos. Estas observações acrescidas de evidências experimentais, surgerem que os LIE chegam à mucosa intestinal pelos capilares sanguíneos da lâmina própria e entram no epitélio pela membrana basal, deixando-o pela mesma via (Fig. 5 - seta) para a seguir cair em nos linfáticos terminais da lâmina própria e voltarem ao ducto torácico (26).

Embora até 50% dos LIE apresentem grânulos citoplasmáticos e que se assemelhem à mastócitos (15) grande parte dos estudos indicam que são principalmente linfócitos T. Sua exata função ainda é desconhecida. A relativa proximidade com a luz intestinal e o aparente trânsito bidirecional sugerem alguma influência da grande carga antigenica presente no lumen intestinal. Assim é que animais gnotobióticos apresentam baixo número de LIE, assim como de plasmócitos, mas a retirada do antígeno alimentar não parece influenciar o número de LIE de animais de experimentação (12).

Quanto aos linfócitos T existentes na lâmina própria sua função em condições normais também ainda está pouco esclarecida. Experimentalmente parece evidente que estão envolvidos na expulsão de parasitas intestinais, contribuindo para a atrofia

Figura 4 - Provável mecanismo de secreção das imunoglobulinas A e M



x = cadeia Y; Y = imunoglobulina (monômero); ~ = componente secretor.

vilositária causada pela infestação.

Influência da idade e da Desnutrição Proteico-Energética (DPE) sobre o número de plasmócitos e de LIE na mucosa intestinal - Em nosso meio, em que prevalece a DPE e a maior parte dos óbitos por diarréia ocorre em baixa idade, é importante avaliar como estes dois fatores - idade e DPE - influenciam a imunidade a nível de mucosa gastrointestinal.

Idade - Assim como ocorre com as Ig circulantes que apresentam concentrações séricas baixas na fase inicial da vida, praticamente inexistem plasmócitos na lámina própria intestinal no primeiro mês de vida (7) e a quantidade de plasmócitos produtores de IgA se apresenta diminuída nos primeiros dois (40) ou três anos de vida (22). No entanto, a capacidade de responder a estímulos抗gênicos no início da vida existe, ao menos para algumas espécies animais estudadas (34) tendo sido demonstrado também que fetos animais conseguem ser imunizados oralmente introduzindo-se抗genos no líquido amniótico (11, 19). Também crianças abaixo dos três anos, que à biópsia mostraram alterações de mucosa intestinal, apresentaram o número de plasmócitos na lámina própria bastante aumentado (22). Estes fatos podem sugerir que o comportamento linfóide na mucosa intestinal está diminuído no início da vida, mais em decorrência de ainda não ter sofrido todos os estímulos抗gênicos, do que propriamente de uma incapacidade imunológica; mas exatamente por não terem ainda tido contato com os agentes agressores e elaborado suas defesas é que os animais e seres humanos são mais suscetíveis à agressões抗gênicas no início da vida, desde que não recebam a proteção do leite materno nesta fase.

Para os LIE não há estudos em humanos em relação à idade, mas tanto no rato (42) quanto no camundongo (13) estão ausentes ao nascimento só surgindo em torno de três semanas, embora ainda em número diminuído em relação a animais adultos.

DPE - Em crianças desnutridas, principalmente nas com DPE intensa, estão diminuídas as Ig secretoras nas secreções (37) e os plasmócitos produtores de IgA (14), embora este último estudo esteja prejudicado por terem sido usadas no grupo controle crianças não desnutridas com gastroenterite aguda.

Quanto aos LIE na DPE ainda existem controvérsias; seria de se esperar que o seu número estivesse diminuído, já que na DPE está diminuído o tamanho do timo e alterada a imunidade celular dependente dos linfócitos T. No entanto, estudo feito em crianças com DPE não revelou alteração nesta variável após recuperação nutricional, mas este estudo não teve grupo controle (41). Por outro lado, tanto ratos adultos (24) como jovens ainda amamentados (42), submetidos à dietas carentes em proteínas, apresentaram número diminuído de LIE, embora nos lactentes estivesse diminuído apenas o número absoluto de LIE e não o número relativo em relação ao número de células epiteliais.

Equilíbrio flora autoctone-hospedeiro - Desconhece-se ainda em que proporção estão

Figura 5 - Linfócitos intraepiteliais (LIE) em mucosa de delgado de rato



➤ LIE atravessando a membrana basal; Coloração pelo PAS, aumento de 600x.

envolvidos os diversos mecanismos que possivelmente regulam o equilíbrio entre o hospedeiro e sua flora autóctone. Além dos mecanismos de defesa inespecíficos, possivelmente estão envolvidos mecanismos imunológicos específicos. Sabe-se que em animais isentos de germes (gnotobióticos) está diminuída a população de células imunocompetentes na mucosa intestinal e a instalação de diferentes linhagens de microrganismos aumenta a população destas células (34) embora só induza baixa concentração de anticorpos séricos (29). Na saliva foram descritas IgA_g capazes de aglutinarem bactérias da flora autóctone e detectados microrganismos da flora normal envoltos por anticorpos (6, 47). Recentemente foram detectados na mucosa (2) e secreção (3) duodenal de crianças, principalmente nas com diarréia, anticorpos anti-bactérias consideradas não patogênicas. O significado destes achados ainda está aberto à discussão. Tem sido aventada também a possibilidade de existir tolerância imunológica para a flora autóctone, isto é, a ausência de resposta imune ao contato抗igenico após contato inicial, sendo que para a aquisição da tolerância parecem essenciais as células de Kupffer hepáticas.

Referências Bibliográficas

1. Ahlstedt, S.; Carlsson, B.; Fallstrom, S.P.; Hanson, L.A.; Holmgren, J.; Lidin-Janson, G.; Lindblad, B.S.; Jodal, U.; Sohl-Akerlund, A. & Wadsworth, C. - Antibodies in human serum and milk induced by enterobacteria and food proteins. In: - Immunology of the gut. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ., p. 115-134, 1977.
2. Avigad, S.; Bampoe, V.; Manuel, P.D.; Walker-Smith, J.A. & Shiner, M. - Small-intestinal mucosal antibodies against antigens of non-pathogenic luminal or mucosal bacteria in young children with and without diarrhoea. Lancet, I:1130-1132, 1978.
3. Bampoe, V.; Elia, C.; Manuel, P.D.; Walker-Smith, J.A. & Shiner, M. - Small intestinal juice and mucosal antibodies against non-pathogenic bacteria, in diarrhoea. Pediatr. Res., 15:1195 (Abstr. 99), 1981.
4. Brandtzaeg, P. & Baklien, K. - Immunoglobulin-producing cells in the intestine in health and disease. Clin. Gastroenterol., 5:251-269, 1976.
5. Brandtzaeg, P. & Baklien, K. - Intestinal secretion of IgA and IgM: a hypothetical model. In: - Immunology of the gut. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ., p. 77-113, 1977.
6. Brandtzaeg, P.; Fjellanger, J. & Gjeruldsen, S.T. - Adsorption of immunoglobulin A onto oral bacteria in vivo. J. Bacteriol., 96:242-244, 1968.
7. Bridges, R.A.; Condie, R.M.; Zak, S.J. & Good, R.A. - The morphologic basis of antibody formation development during the neonatal period. J. Lab. Clin. Med., 53:331-357, 1959.
8. Brown, W.R. - Relationships between immunoglobulins and the intestinal epithelium. Gastroenterology, 75:129-138, 1978.
9. Cebara, J.J.; Kamat, R.; Gearhart, P.; Robertson, S.M. & Tseng, J. - The secretory IgA system of the gut. In: - Immunology of the gut. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ., p. 5-28, 1977.
10. Clancy, R.L. & Bienenstock, J. - Enteric infection and immunization. In: - Immunological aspects of the liver and gastrointestinal tract. Baltimore, Univ. Park Press, p. 121-152, 1976.

11. Conner, G.H.; Richardson, M. & Carter, G.R. - Prenatal immunization and protection of the newborn: ovine and bovine fetuses vaccinated with *Escherichia coli* antigens by the oral route and exposed to challenge inoculum at birth. Amer. J. Vet. Res., 34:737-741, 1973.
12. Ferguson, A. - Intraepithelial lymphocytes of the small intestine. Gut, 18:921-937, 1977.
13. Fichtelius, K.E.; Yunis, E.J. & Good, R.A. - Occurrence of lymphocytes within the gut epithelium of normal and neonatally thymectomized mice. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 128:185-188, 1968.
14. Green, F. & Heyworth, B. - Immunoglobulin - containing cells in jejunal mucosa of children with protein-energy malnutrition and gastroenteritis. Arch. Dis. Child., 55:380-383, 1980.
15. Guy-Grand, D; Griscelli, C. & Vassalli, P. - The mouse gut T lymphocyte a novel type of T cell. J. Exp. Med., 148:1661-1677, 1978.
16. Hamilton, J.R.; Gall, D.G.; Kerzner, B.; Butler, D.G. & Middleton, P. - Recent developments in viral gastroenteritis. Ped. Clin. N. Am., 22:747-755, 1975.
17. Holmgren, J. & Svennerholm, A.M. - Mechanisms of disease and immunity in cholera: a review. J. Infect. Dis., 136:S105-112, 1977.
18. Holmgren, J. & Svennerholm, A.M. - Pathogenic mechanisms and new perspectives in the treatment and prevention of enteric infections. Scand. J. Gastroenterol., 17(S77):47-59, 1982.
19. Husband, A.J. & McDowell, G.H. - Local and systemic immune responses following oral immunization of foetal lambs. Immunology, 29:1019-1022, 1975.
20. Husband, A.J.; Monié, H.J. & Gowans, J.L. - The natural history of the cells producing IgA in the gut. In: - Immunology of the gut. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ., p. 29-54, 1977.
21. Kleinman, R.E. & Walker, W.A. - The enteromammary immune system: an important new concept in breast milk host defense. Digest Dis. Sci., 24:876-882, 1979.
22. Maffei, H.V.L.; Kingston, D.; Hill, I.D. & Shiner, M. - Histopathologic changes and the immune response within the jejunal mucosa in infants and children. Pediatr. Res., 13:733-736, 1979.
23. Maffei, H.V.L. & Nóbrega, F.J. - Gastric pH and microflora of normal and diarrhoeic infants. Gut, 16:719-726, 1975.
24. Maffei, H.V.L.; Rodrigues, M.A.M.; Camargo, J.L.V. de & Campana, A.O. - Intraepithelial lymphocytes in the jejunal mucosa of malnourished rats. Gut, 21:32-36, 1980.
25. Magnusson, K.E.; Stendahl, O.; Stjernström, I. & Edebo, L. - Reduction of phagocytosis, surface hydrophobicity and charge of *Salmonella typhimurium* 395MR10 by reaction with secretory IgA. Immunology, 36:439-447, 1979.
26. Marsh, M.N. - Studies of intestinal lymphoid tissue. I - Electron microscopic evidence of "blast transformation" in epithelial lymphocytes of mouse small intestinal mucosa. II - Aspects of proliferation and migration of epithelial lymphocytes in the small intestine of mice. Gut, 16:665-682, 1975.

27. Masson, P.L.; Heremans, J.F. & Dive, C. - An iron-binding protein common to many external secretions. *Clin. Chim. Acta.*, 14:735, 1966.
28. McClelland, D.B.L.; Samson, R.R.; Parkin, D.M. & Shearman, D.J.C. - Bacterial agglutination studies with secretory IgA prepared from human gastrointestinal secretions and colostrum. *Gut*, 13:450-458, 1972.
29. McNabb, P.C. & Tomasi Jr., T.B. - Host defense mechanisms at mucosal surfaces. *Ann. Review Microbiol.*, 35:477-496, 1981.
30. McNeish, A.S.; Evans, N.; Gase, H. & Rogers, K.B. - The agglutinating antibody response in the duodenum in infants with enteropathic *E. coli* gastroenteritis. *Gut*, 16:727-731, 1975.
31. Ogra, P.L.; Karzon, D.T.; Righthand, F. & MacGillivray, M. - Immunoglobulins in serum and secretions after poliovaccine and infection. *N. Engl. J. Med.*, 279:893-900, 1968.
32. Owen, R.L. & Jones, A.L. - Epithelial cell specialization within human Peyer's patches: an ultrastructural study of intestinal lymphoid follicles. *Gastroenterology*, 66:189-203, 1974.
33. Pittard, W.B. - Breast-milk immunology: a frontier in infant nutrition. *Amer. J. Dis. Child.*, 133:83-87, 1979.
34. Porter, P.; Kenworthy, R.; Noakes, D.E. & Allen, W.D. - Intestinal antibody secretion in the young pig in response to oral immunization with *E. coli*. *Immunology*, 27:841-853, 1974.
35. Porter, P.; Parry, S.H. & Allen, W.D. - Significance on immune mechanisms in relation to enteric infections of the gastrointestinal tract in animals. In: - *Immunology of the gut*. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ., p. 55-75, 1977.
36. Prince, A.S. & Neu, H.C. - Antibiotic - associated pseudomembranous colitis in children. *Ped. Cl. N. Am.*, 26:261-268, 1979.
37. Reddy, V.; Raghuramulu, N. & Bhaskaram, C. - Secretory IgA in protein-calorie malnutrition. *Arch. Dis. Child.*, 51:871-874, 1976.
38. Sack, R.B. - Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization. *J. Infect. Dis.*, 142:279-286, 1980.
39. Savage, D.C. - Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, 31:107-133, 1977.
40. Savilahti, E. - Immunoglobulin - containing cells in the intestinal mucosa and immunoglobulins in the intestinal juice in children. *Clin. exp. Immunol.*, 11:415-425, 1972.
41. Schwartz, F.C.; Chitiyo, M.E. & Wolfsdorf, J. - Intra-epithelial lymphocytes in the jejunum of malnourished children. *South Afr. Med. J.*, 48:2.128, 1974.
42. Sugihara, C.Y.; Rodrigues, M.A.M.; Souza, L.M.S & Maffei, H.V.L. - Intraepithelial lymphocytes in fetal and post-natal malnutrition: an experimental study in 21 days old rats. *Arg. Gastroent. (S.P.)*, 17:41, 1980.
43. Tomasi Jr., T.B.; Larson, L.; Challacombe, S. & McNabb, P. - Mucosal immunity: the origin and migration patterns of cells in the secretory system. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 65:12-19, 1980.

44. Tommasi Jr., T.B.; Tan, E.M.; Solomon, A. & Prendergast, R.A. - Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *J. Exper. med.*, 121:101-124, 1965.
45. Waaij, D.V.D.; Vossen, J.M.; Altes, C.K. & Hartgrink, C. - Reconvalescence following antibiotic decontamination in man and animals. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 30:1887-1895, 1977.
46. Walker, W.A.; Abel, S.N.; Wu, M. & Bloch, K.J. - Intestinal uptake of macromolecules. V - Comparison of the in vitro uptake by rat small intestine of antigen-antibody complexes prepared in antibody or antigen excess. *J. Immunol.*, 117:1028-1032, 1976.
47. Williams, R.C. & Gibbons, R.J. - Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A: a mechanism of antigen disposal. *Science*, 117:697-699, 1972.

INFLUÊNCIA DO ACETATO DE SÓDIO NA PRODUÇÃO CELULAR DE LIPÍDIOS E NO "UP TAKE" DE M_N E F_E DE CHLORELLA VULGARIS

Carlos Augusto Montenegro Ferraz
Karin Gisela Frey
& Eugênio Aquarone

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Dept^o de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Caixa Postal 30786
01000 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Microalgas verdes produzem substâncias orgânicas com alta eficiência, utilizando apenas dióxido de carbono e luz. Entretanto, uma fonte de carbono orgânico (acetato de sódio) fornecida a culturas de *Chlorella vulgaris* pode influenciar enormemente a quantidade celular de lipídios, seu crescimento e suas necessidades nutricionais iônicas. Discutimos tais influências, principalmente quanto à fração lipídica e ao consumo de manganez e ferro. Os dados obtidos sugerem um interessante campo de pesquisa em metabolismo microbiano e em obtenção de biomassa.

Summary

Influence of the sodium acetate on the production of cellular lipids and uptake of Mn and Fe in Chlorella vulgaris

Microalgae produce organic substances at high efficiency utilizing only light and carbon dioxide. Furthermore, an organic carbon source (sodium acetate) supplied to cultures of *Chlorella vulgaris* may greatly influence the amount of cellular lipids, its growth and its nutritional ionic requirements. These influence were studied, mainly the lipid fraction and the uptake of manganese and iron. The data indicate an interesting field for research on microbiological metabolism and on biomass production.

Introdução

Nas últimas décadas têm-se dado uma grande atenção ao estudo das microalgas verdes (*Chlorophyceae*) (1, 2, 4, 5, 7, 14, 16, 18, 20).

Esta tendência ocorre em função das interessantes características e aplicações destes microrganismos. Seu metabolismo propicia-lhes crescimento tanto às custas de energia luminosa quanto através de fonte de carbono orgânico. O metabolismo onde ocorre a coexistência destes dois mecanismos é denominado mixotrofia, ao passo que o crescimento utilizando apenas fonte de carbono é conhecido como heterotrofia. Já o metabolismo baseado na energia luminosa é denominado autotrofia, sendo basicamente o mesmo executado pelas plantas superiores (15, 19).

Além do que, um conhecimento mais profundo a respeito de sua fisiologia do crescimento, trará como benefício uma fonte não convencional de proteínas e lipídios,

servindo talvez como complementação da alimentação humana e animal (3, 6, 8, 9, 10, 11).

Material e Métodos

Microrganismo e condições de cultura - Em todos os experimentos utilizaram-se culturas de *Chlorella vulgaris* obtidas da CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) e classificadas pelo Instituto de Botânica da Secretaria de Agricultura do Estado de São Paulo.

As microalgas foram cultivadas sob condições estéreis em frascos Erlenmeyer de 250ml, contendo cada um 100ml de meio de cultura. O inóculo para cada frasco foi calculado de modo a representar 10% (v/v) do volume e apresentar no início da cultura, 25mg de massa seca/litro. Os frascos foram mantidos sob agitação de 240rpm, iluminação de 2.800 lux a 3.200 lux e temperatura entre 25 e 27°C. Não se utilizou CO₂ além do normalmente presente na atmosfera, uma vez que os frascos foram isolados do meio ambiente com tampões de algodão esterilizado e envoltos com papel alumínio.

Como fonte de carbono orgânico empregou-se acetato de sódio, em quantidade suficiente para obtermos uma concentração final de 0,5% (P/v).

O meio de cultura, por nós estabelecido e denominado "E" (enriquecido), apresentou a seguinte composição: KNO₃ 2,5g/l, MnSO₄ · 4H₂O 0,002g/l, FeSO₄ · 7H₂O 0,1g/l, CaCl₂ · 2H₂O 0,02g/l, KH₂PO₄ 0,65g/l, MgSO₄ · 7H₂O 1,00g/l, ZnSO₄ · 7H₂O 0,005g/l, CuSO₄ · 5H₂O 0,005g/l, H₃BO₃ 0,002g/l, Na₂MnO₄ · H₂O 0,10g/l e Na₂WO₄ · 2H₂O 0,001g/l (o pH é de cerca de 6,5).

As culturas foram efetuadas em condições autotróficas, heterotróficas e mixotróficas.

Avaliação do crescimento - Com as amostras colhidas das culturas durante o crescimento celular, foram realizadas medidas de absorbância em espectrofotômetro Coleman, no comprimento de onda correspondente à máxima absorção de cultura de *Chlorella vulgaris* (440nm), tomando-se como referência o meio "E".

As determinações de massa seca foram obtidas por filtração em membrana Millipore® (0,22µm) de amostras das culturas de *Chlorella vulgaris*, com posterior secagem em estufa à vácuo (30°C - 35°C) até peso constante. Utilizou-se como branco de referência o meio "E", com o mesmo volume utilizado nas amostras das culturas.

Obtenção da fração lipídica - Após crescimento máximo as culturas foram filtradas e levadas à estufa à vácuo, sendo a temperatura mantida entre 25 e 45°C. Cerca de 1,0 a 1,5g deste material foi submetido à extração em Soxhlet com clorofórmio-metanol (2/1) por 18 horas. Após este tratamento, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a vácuo. O resíduo obtido após a evaporação dos solventes foi levado à estufa a vácuo (35°C) até peso constante (15).

Consumo ("uptake") de manganês e ferro do meio - Realizado em espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer model 303, empregando lâmpada de catodo ôco específica para íons cobre como referência para calibração (6, 7).

Resultados

O pH do meio de cultura autotrófica não variou, mantendo-se ao redor de 6,5. Já para as culturas que utilizaram acetato de sódio e CO₂ atmosférico, o pH final esteve ao redor de 10,0 após 150 horas de cultura. Tais variações ocorreram embora o pH inicial fosse o mesmo (6, 5) para todas culturas. Conforme nota-se pelas curvas de crescimento representadas pela Figura 1, a cultura autotrófica apresentou o menor crescimento, ao passo que a cultura mixotrófica teve crescimento bem superior, ficando a cultura heterotrófica em posição intermediária.

Os valores obtidos (massa seca/volume) foram: cultura autotrófica - 0,34g/l; cultura mixotrófica - 1,90g/l; cultura heterotrófica - 0,74g/l.

Entretanto, o crescimento máximo para cada cultura foi obtido em tempos diferentes. Para analisarmos a eficiência de cada condição de cultura definiremos o parâmetro produtividade, expressando o crescimento máximo obtido por unidade de tempo. O parâmetro produtividade é apresentado na Figura 2.

Observando os extratos lipídicos constatamos a maior porcentagem para a cultura mixotrófica, seguida da cultura heterotrófica e com o menor valor a cultura autotrófica.

Os valores obtidos (P/P) da fração lipídica em relação à massa seca (após crescimento máximo) foram: cultura autotrófica - 28,5%; cultura mixotrófica - 64,5%; cultura heterotrófica - 52,6%.

Os valores representam a fração lipídica total, incluindo portanto os pigmentos clorofílicos, carotenoides, vitaminas lipossolúveis e esteroides.

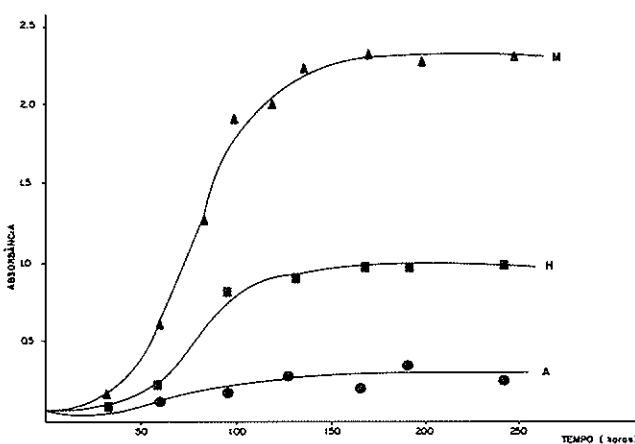
Quanto aos dados de consumo ("uptake") de manganês e ferro, notamos que após o crescimento máximo das culturas, tais íons haviam reduzido suas concentrações a valores bem inferiores aos iniciais. Exceção feita ao manganês em cultura autotrófica, onde após o crescimento máximo, obtivemos valores próximos aos iniciais, denotando pequeno consumo (Figuras 3 e 4).

Discussão

A cultura mixotrófica utilizando simultaneamente a via fotossintetizante (CO_2 e luz) e a via metabólica do acetato de sódio apresentou um crescimento superior ao esperado pela simples somatória das biomassas obtidas por autotrofia e heterotrofia. Através desta observação supomos que em mixotrofia a via fotossintetizante e a via utilizadora de acetato de sódio estão interligadas de modo a potenciar suas atividades metabólicas.

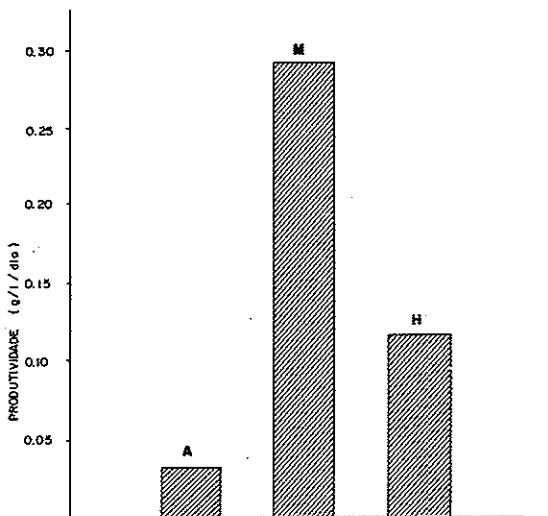
A variação de pH nas culturas mixotróficas e heterotróficas pode ser explicada pelo consumo de acetato de sódio, uma vez que na cultura autotrófica o pH permaneceu praticamente inalterado com o decorrer do crescimento.

Figura 1 - Curvas de crescimento de *Chlorella vulgaris* em diferentes condições de cultura



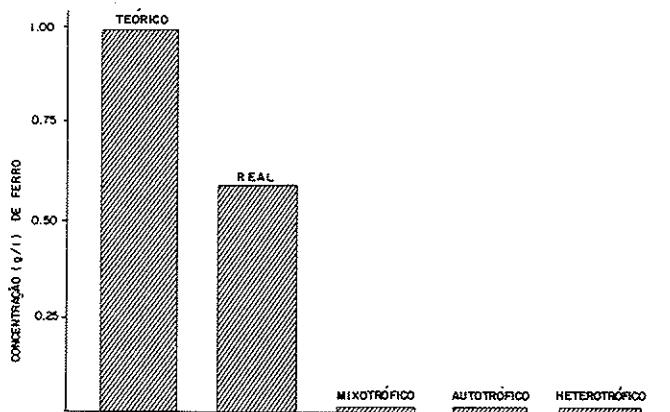
M - Mixotrofia; H - Heterotrofia; A - Autotrofia.

Figura 2 - Produtividade (g/l/dia) em massa celular de diferentes condições de cultura de *Chlorella vulgaris*



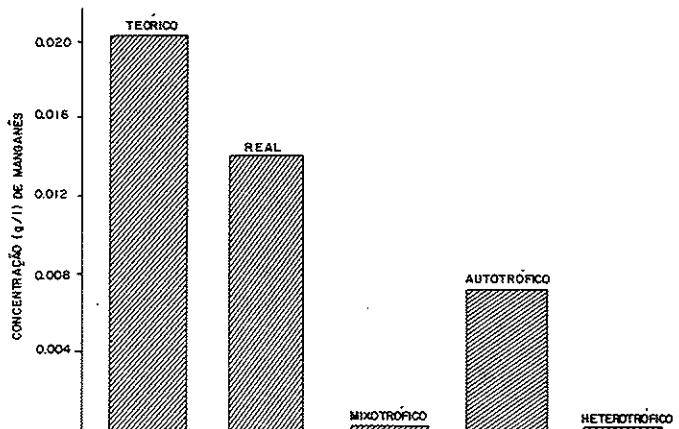
A - Autotrofia; M - Mixotrofia; H - Heterotrofia.

Figura 3 - Concentração de íons Ferro determinada no meio de cultura, antes e após o crescimento máximo de *Chlorella vulgaris*



A porcentagem de fração lipídica nas culturas mixotróficas e heterotróficas foi bem superior à encontrada nas culturas autotróficas, denotando a influência positiva do acetato de sódio na biossíntese de material lipídico em *Chlorella vulgaris*.

Figura 4 - Concentração de íons Manganês determinada no meio de cultura, antes e após o crescimento máximo de *Chlorella vulgaris*



O "uptake" de manganês e ferro foi significativo durante o crescimento celular, sugerindo serem estes íons importantes para os processos metabólicos, tornando-se fatores limitantes para o crescimento celular quando suas concentrações no meio de cultura apresentam-se diminuídas (12, 17). Exceção feita ao manganês, pois apesar de um crescimento máximo autotrófico, não foi consumido na mesma proporção que nas demais culturas, indicando não ser fator limitante na concentração inicial utilizada.

Os resultados obtidos indicam inúmeras possibilidades de estudos de metabolismo e perspectiva de utilização das microalgas verdes na depuração de resíduos industriais (por exemplo a vinhaça), com simultânea obtenção de biomassa.

Agradecimentos

Ao Departamento de Química Fundamental (Química Analítica) do IQUSP pelo uso do Espectrofotômetro de Absorção Atômica, aos colegas professores do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF pelas sugestões e a Sra. Maria Cristina de Arruda Tavares pela execução das figuras.

Referências Bibliográficas

1. Barroso, C.V. & Nonato, A.M.J. - Influência de fatores de crescimento em *Chlorella*. Rev. Microbiol., 9:84-87, 1978.
2. Benemann, J.; Weisman, J.; Kopman, B. & Oswald, W. - Energy production by microbial photosynthesis. Nature, 286:19-23, 1977.
3. Coombs, G.E. - Algae (*Chlorella*) as a source of nutriens for the chick. Science, 116:453-454, 1952.
4. Endo, H.; Nakajima, K.; Chino, R. & Shirora, M. - Growth characteristics and cellular components of *Chlorella regularis*, heterotrophic fast growth strain. Agric. Biol. Chem., 38:9-18, 1974.
5. França, F.P. & Yuan, M.C. - Influência da concentração de NaNO₃ na produção de biomassa de *Chlorella homosphaera*. Rev. Microbiol., 9:88-91, 1978.
6. Geoghegan, M.J. - Unicellular algae as a source of food. Nature, 168:425-426, 1951.
7. Iwata, I.; Nakata, H.; Mizushima, M. & Sakurai, Y. - Lipids of algae. Agric. Biol. Chem., 25:319-325, 1961.
8. Materassi, R.; Paoletti, C. & Balloni, W. - La coltura di microaliche anche come sistema di produzione di grassi. Riv. It. Sostanze Grasse, 54:109-113, 1977.
9. Milner, H.W. - Algae as food. Scien. Amer., 189:31-35, 1953.
10. Mitsuda, H. - Utilization of *Chlorella* for food. Paper presented at First International Congress of Food Science and Technology, London, September, 1962.
11. Myers, J.; Phillip Jr., J.N. & Grahame, J.R. - On the mass culture of algae. Plant. Physiol., 26:539-548, 1951.
12. Nakajima, A. & Horikoshi, T. - Uptake of manganese ion by *Chlorella regularis*. Agric. Biol. Chem., 43:1461-1464, 1979.
13. Nakayama, O.; Ueno, T. & Tsuchiya, F. - Heterotrophic culture of algae in a closed system. J. Ferm. Technol., 52:225-232, 1974.
14. Ogawa, T. & Terui, G. - Studies on the growth of *Spirulina platensis*. I - On the pure culture of *Spirulina platensis*. J. Ferm. Technol., 48:361-367, 1970.
15. Paoletti, C.; Materassi, R.; Pelosi, E. & Tofani, A. - Influenza delle condizioni culturali sulla composizione in acidi grassi di *Scenedesmus* spp. Riv. It. Sostanze Grasse, 52:203-206, 1975.

16. Pirt, M.W. & Pirt, S.J. - Photosynthetic production of biomass and starch by *Chlorella* in chemostat culture. *J. Appl. Chem. Biotechnol.*, 27:643-650, 1977.
17. Pirt, S.J. & Walach, M. - Biomass yields of *Chlorella* from ion (Y_x/Fe) in iron-limited batch cultures. *Arch. Microbiol.*, 116:293-296, 1978.
18. Pratt, R. & Johnson, E. - Production of protein and lipid by *Chlorella vulgaris* and *Chlorella pyrenoidosa*. *J. Pharm. Sci.*, 52:979-984, 1963.
19. Shibata, K. - Spectroscopic studies on chlorophyll formation in intact leaves. *J. Biochem.*, 44:147-173, 1957.
20. Sporehr, H.A. & Milner, H.W. - The chemical composition of *Chlorella*: effect of environmental conditions. *Plant. Physiol.*, 24:120-149, 1949.

UTILIZAÇÃO DA LUZ ULTRA-VIOLETA NO MELHORAMENTO DE ASPERGILLUS NIGER PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO CÍTRICO¹

Ivanhoé Rodrigues Baracho
& Sonia Ferrão de Aquino Pereira

Deptº de Genética e Evolução
Instituto de Biologia UNICAMP
Caixa Postal 6109
13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

Uma linhagem de *Aspergillus niger* usada para produção de ácido cítrico foi submetida a múltiplas irradiações com luz ultra-violeta. Para cada irradiação, trinta colônias foram isoladas ao acaso, analisadas quantitativamente quanto à acidez total e selecionadas as linhagens mais produtoras de ácido. Foram conduzidos oito ciclos de seleção, e a linhagem selecionada em cada ciclo foi analisada quanto à produção de ácido cítrico. Em apenas um caso a produção de ácido cítrico foi maior do que a linhagem original. Os dados, entretanto, mostraram que a luz ultra-violeta apenas provocou efeitos de natureza fisiológica sobre as linhagens utilizadas.

Summary

Utilization of ultraviolet light in the improvement of Aspergillus niger for citric acid production

A strain of *Aspergillus niger* used for citric acid production was submitted to multiple irradiation with ultraviolet light. For each irradiation thirty colonies were isolated at random, analyzed quantitatively in terms of total acidity and the better acid producing strains were selected. Eight selection cycles were carried out, and the strain selected in each cycle was analyzed for citric acid production. In one case the citric acid production exceeded the original strain. However, the data showed that the ultraviolet light only provoked effects of a probably physiological nature on the strains analyzed.

Introdução

Entre as muitas espécies de *Aspergillus* que constituem o grupo "niger" uma das mais abundantes é *Aspergillus niger* van Tieghem, espécie que ocorre nos mais diversos solos e nos mais diversos substratos (10). Ela tem também grande importância econômica, sendo usada para produção de diversos ácidos orgânicos, inclusive o ácido cítrico que é, atualmente, seu produto industrial mais importante.

Muitos trabalhos são conduzidos, visando o melhoramento do *A. niger* para produção industrial (1, 2, 12). No que diz respeito ao melhoramento da produção de ácido cítrico, várias técnicas são usadas, entre essas a de induzir mutações e selecionar a

seguir, os mutantes mais apropriados. Em alguns casos a luz ultra-violeta foi empregada, com resultado satisfatório (3), embora alguns autores considerem que outros mutagênicos sejam mais eficazes (5, 6).

O objetivo desse trabalho é estudar o melhoramento do *A. niger* para produção de ácido cítrico, utilizando a luz ultra-violeta como agente mutagênico.

Material e Métodos

Meio - O meio mínimo (MM) foi o Czapecck-Dox com 1% (p/v) de glicose e 2% de ágar. O meio de fermentação foi o mesmo usado por Doelger & Prescott (4).

Organismo - Foi utilizado a linhagem 10v10 de *Aspergillus niger* do Laboratório de Genética de Microrganismos da Unicamp, que é de origem industrial, e é usada na produção de ácido cítrico, pelo método de fermentação de superfície. Essa linhagem e seus derivados foram mantidos à 4°C, em MM inclinado.

Irradiação - Conídios provenientes de culturas de 8 dias, em meio mínimo, foram transferidos para solução de Tween 80 (0,1% v/v) desagregados por agitação, e convenientemente ressuspensos em solução salina, de modo a se ter três mil conídios por ml, os quais foram expostos à luz ultra-violeta cujo comprimento de onda era de 254nm, nos tempos de 5, 10, 20 e 40 minutos. Conídios não irradiados foram usados como controle. A curva de sobrevivência mostrou que 30% de sobreviventes foi obtido com 15 minutos de irradiação, e essa dose foi escolhida para os estudos posteriores.

Seleção - Conídios irradiados por 15 minutos eram convenientemente ressuspensos em salina e semeados em placas de Petri, com MM, de modo a se obter 20 colônias por placa. Dessa placas escolhiam-se, ao acaso, 30 colônias que eram repicadas para placas com meio mínimo, colocando-se quatro colônias por placa. Depois de 5 dias de incubação à 28°C, de cada colônia, eram retirados conídios e inoculados em tubos de ensaio contendo 3ml de meio de fermentação. Esses tubos eram incubados por 7 dias à 28°C, a seguir fazia-se a determinação de ácidos totais.

As colônias que apresentavam maior produção de ácidos, eram submetidos a outro ciclo de seleção.

Os isolados selecionados foram denominados pela letra S, seguida de índice indicando ciclo de seleção e de um traço seguido do número do isolado. Exemplo: S3-12, isolado nº 12, do 3º ciclo de seleção.

Fermentação - Os isolados selecionados em cada ciclo de seleção foram mantidos em MM inclinado à 4°C posteriormente analisados quanto à produção de ácido cítrico, pelo método de fermentação em cultura de superfície. Cada isolado era inoculado em placas contendo MM, e incubado a 28°C. Depois de 8 dias de incubação, conídios dessas colônias eram suspensos em salina para dar concentração de 1×10^6 esporos/ml, e 1ml dessa suspensão era usada para inocular 50ml de meio de fermentação, contido em Erlenmeyer de 250ml. Esses Erlenmeyers eram incubados à 28°C e depois de 7 dias, determinava-se no meio filtrado, ácidos totais e concentração de ácido cítrico.

Determinação de ácido cítrico e de ácidos totais - Ácidos totais foram determinados pela titulação de 1ml de meio filtrado com aliquotas de NaOH 0,1N, usando fenolftaleína (1%) como indicador. A concentração de ácido cítrico foi determinada pelo método de Marier & Boulet (7).

Resultados

Segundo a metodologia já descrita foram conduzidos 8 ciclos de seleção, selecionando-se em cada ciclo, o isolado que apresentava o maior valor de titulação, entre os 30 examinados. Os resultados dos valores de titulação são apresentados na Tabela 1. Nessa tabela pode-se ver que o isolado S4-20 deu origem a dois ciclos de

seleção, a seleção 5.1 e a seleção 5.2. No ciclo de seleção 5.1 foi escolhido o isolado S5.1-12, que deu origem ao ciclo 6.1, no qual só foram encontrados isolados com valores baixos de titulação. Em face disso o isolado S4-20 foi utilizado em outro ciclo de seleção, o ciclo 5.2, no qual foi selecionado o isolado S5.2-22, que deu origem à seleção 6.2.

Os dados da Tabela 1 foram grupados, dividindo-se cada conjunto de isolados em 5 grupos, e para cada grupo assim formado determinou-se o coeficiente de variação, o qual é apresentado na Tabela 2. Os dados da Tabela 2 foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis (11), constatando-se um valor de $H = 18,140$ significativo a 5%. A comparação entre os conjuntos de isolados revelou que houve diferença significativa apenas entre o conjunto S1 e o conjunto S5.1.

A linhagem original 10v10 e os isolados selecionados em cada ciclo de seleção foram analisados quanto à produção de ácidos totais e de ácido cítrico. Os resultados dessa análise são apresentados na Tabela 3. Os dados de produção de ácido cítrico, apresentados nessa tabela, foram submetidos à análise de variância (9) constatando-se um valor de $F = 3,08$, significativo do nível de 5% (graus de liberdade: 6 para tratamento, 28 para o resíduo; coeficiente de variação = 17,2%). A comparação das medidas de produção de ácido cítrico, entre os diversos isolados foi feita pelo teste de Tukey (9), e os resultados são apresentados na Tabela 4, na qual verifica-se diferença significativa entre a linhagem 10v10 e o isolado S3-12.

A Tabela 5 apresenta, para cada ciclo de seleção, a média de titulação dos diversos conjuntos de isolados bem como os coeficientes de variação encontrados. A mesma tabela também apresenta as médias de titulação e de produção de ácido cítrico para cada isolado selecionado.

Aos dados extraídos da Tabela 5 aplicou-se o teste de correlação de Spearman (11), o qual mostrou que, para os isolados selecionados, há correlação positiva entre ciclo de seleção e produção de ácido cítrico ($r_s = 0,723$), entre ciclo de seleção e valores de titulação ($r_s = 0,820$) e entre valores de titulação e produção de ácido cítrico ($r_s = 0,883$). O mesmo teste também mostrou que os ciclos de seleção

Tabela 1 - Valores de titulação (ml de NaOH 0,1N) para cada isolado, nos diversos ciclos de seleção

Seleção	1	2	3	4	5.1	6.1	5.2	6.2
Origem	10v10	S ₁ -29	S ₂ -7	S ₃ -12	S ₄ -20	S _{5.1} -12	S ₄ -20	S _{5.2} -20
Isolados								
1	3,5	6,7	5,0	8,4	8,7	1,5	6,0	8,5
2	0,8	9,4	6,2	12,1	7,7	1,7	6,0	4,4
3	0,7	9,4	6,2	8,7	8,9	1,5	5,5	8,2
4	0,5	9,7	7,4	10,1	8,8	1,2	5,7	6,6
5	0,7	8,5	6,7	9,2	7,8	2,6	5,8	5,3
6	-	8,4	6,8	10,2	9,2	1,6	5,7	6,2
7	1,0	9,5*	8,4	8,9	8,2	1,5	3,8	6,6
8	-	6,0	-	8,1	9,8	1,5	3,9	9,1
9	0,8	3,3	8,5	7,6	8,2	1,5	6,2	7,1
10	-	5,6	5,7	3,2	8,4	1,5	3,5	8,7
11	3,0	4,0	4,3	8,8	8,9	2,4	5,7	8,4
12	3,5	6,7	8,7*	11,1	11,0*	1,5	4,7	10,3
13	0,3	7,1	4,7	10,0	8,5	1,1	4,7	7,4
14	0,2	6,3	6,0	8,2	10,0	1,4	4,7	8,0
15	0,3	8,3	7,9	9,7	9,8	1,0	3,7	13,5
16	0,5	7,6	7,1	9,2	9,8	0,6	5,2	9,4
17	0,5	7,0	5,5	8,8	8,0	2,0	6,5	7,5
18	-	7,8	6,6	1,3	9,7	2,4	5,4	9,6
19	2,8	4,0	6,2	11,7	8,9	1,2	5,9	5,7
20	4,4	6,2	4,6	13,0*	9,1	1,0	5,4	8,0
21	0,3	6,8	5,7	12,7	8,7	1,0	7,4	9,7
22	0,3	7,6	5,5	10,7	7,9	1,6	7,6*	8,0
23	0,4	5,7	6,9	0,9	9,7	1,0	4,5	9,2
24	0,5	7,0	7,0	10,2	11,0	1,6	0,1	7,8
25	0,5	4,0	6,3	11,5	7,9	1,4	5,1	10,4
26	0,4	7,4	7,0	12,8	7,8	1,5	5,5	14,6*
27	0,4	6,9	5,9	12,9	7,8	0,9	4,7	9,9
28	0,5	6,5	8,5	11,7	7,4	1,0	4,8	11,8
29	5,5*	9,0	7,9	11,1	4,8	2,4	6,4	10,7
30	3,6	3,5	6,7	8,7	4,8	1,8	5,1	9,2

* = linhagem selecionada; (-) = valor não determinado.

A Tabela 5 apresenta, para cada ciclo de seleção, a média de titulação dos diversos conjuntos de isolados bem como os coeficientes de variação encontrados. A mesma tabela também apresenta as médias de titulação e de produção de ácido cítrico para cada isolado selecionado.

Aos dados extraídos da Tabela 5 aplicou-se o teste de correlação de Spearman (11), o qual mostrou que, para os isolados selecionados, há correlação positiva entre ciclo de seleção e produção de ácido cítrico ($r_s = 0,723$), entre ciclo de seleção e valores de titulação ($r_s = 0,820$) e entre valores de titulação e produção de ácido cítrico ($r_s = 0,883$). O mesmo teste também mostrou que os ciclos de seleção

não estão correlacionados com as médias de titulação dos conjuntos de isolados ($r_s = 0,486$) nem com os seus coeficientes de variação ($r_s = 0,257$).

Discussão

Através da técnica de seleção empregada foi possível obter o isolado S3-12, cuja produção foi 51,3% maior do que a da linhagem original 10v10. Esse isolado foi obtido no 3º ciclo de seleção. A produção dos isolados que foram selecionados posteriormente não diferiu significativamente da produção da linhagem original, nem da produção do isolado S3-12. É possível que, no 3º ciclo de seleção, se tenha atingido um platô para aquelas condições culturais.

No que diz respeito à produção de ácidos totais, o comportamento dos conjuntos de isolados e dos isolados selecionados, apresentou diferenças. As médias de titulação e os ciclos de seleção estão correlacionados nos isolados selecionados, mas não nos conjuntos de isolados, que por sua vez também apresentaram maior variabilidade (Tabela 5). Esse aumento da variabilidade é, sem dúvida, uma consequência da ação da luz ultra-violeta, que alterou fisiologicamente os isolados de maneira diversa. A variabilidade dos conjuntos de isolados, contudo, nem aumenta nem diminui com o ciclo de seleção, pois não está correlacionada com ele.

A linhagem 10v10 é uma linhagem de alta produção de ácido cítrico, mas apresenta grande instabilidade, não apenas relacionada com a produção, mas também com a formação de setores (13, 14). Nesse trabalho essa instabilidade foi verificada, pois a produção de ácidos totais se manteve em nível alto até o ciclo de seleção 5.1 e caiu bruscamente no ciclo 6.1.

Os mecanismos dessa instabilidade de linhagem 10v10 não foram evidenciados. Nessa linhagem a alta produção de ácido cítrico, talvez esteja na dependência de substâncias reguladoras, cuja formação dependeria de genes apenas ativos nos estágios iniciais de desenvolvimento do fungo. Como a atividade desses genes estaria relacionada com condições citoplasmáticas, fatores alterando essas condições poderiam interferir com a produção de ácido cítrico. Isso talvez explique os efeitos da luz ultra-violeta que foram verificados nesse trabalho e os efeitos de alguns meios de culturas (8), utilizados na manutenção da linhagem.

Tabela 2 - Coeficientes de variação (em percentagem) relativo aos dados da Tabela 1, para cada ciclo de seleção (valores de 5 grupos para cada ciclo)

Ciclo de seleção							
1	2	3	4	5.1	6.1	5.2	6.2
102,25	11,52	12,70	13,77	7,26	28,43	3,33	24,52
66,24	37,49	28,09	37,67	12,30	22,27	23,86	16,14
30,46	9,53	18,21	41,69	8,97	47,29	18,46	24,82
120,15	20,39	15,22	45,87	30,79	23,88	53,26	17,21
121,83	33,71	13,95	42,20	22,52	36,76	11,81	17,30

Tabela 3 - Valores de titulação (ml de NaOH, 0,1N) e concentrações de ácido cítrico (mg/ml de meio) da linhagem 10v10 e de cada isolado selecionado, determinados em 5 repetições

Isolados	a.c.	T								
10v10	72	10,4	108	12,6	72	10,9	143	14,5	79	10,0
S ₁ -29	100	11,6	100	11,9	107	12,1	143	15,4	107	12,6
S ₂ -7	72	8,8	108	12,6	143	14,6	144	14,5	144	15,6
S ₃ -12	143	15,0	144	13,7	143	15,0	143	15,5	144	14,7
S ₄ -20	143	15,5	143	15,4	107	12,5	144	14,6	143	16,3
S _{5,2} -22	100	11,3	108	13,1	143	16,0	143	14,8	148	13,2
S _{6,2} -26	143	15,5	115	13,2	136	14,0	143	15,4	143	16,1

a.c. - ácido cítrico; T - titulação.

Tabela 4 - Teste de Tukey para os dados de produção de ácido cítrico da Tabela 3

Isolados	Médias
S ₃	143,4 a
S ₄	136,0 a b
S ₆	136,0 a b
S ₅	128,0 a b
S ₂	122,2 a b
S ₁	111,4 a b
10v10	94,8 b

Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si, ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 5 - Valores de titulação (ml de NaOH 0,1N) para os conjuntos de isolados e os isolados selecionados, com os respectivos coeficientes de variação (C.V.) e concentrações de ácido cítrico (mg/ml de meio) para os isolados selecionados, em cada ciclo de seleção

Ciclo de seleção	Conjunto de isolados		Isolados selecionados		
	Médias	C.V. (%)	Titulação		Ácido cítrico (médias)
			Média	C.V. (%)	
0	-	-	11,68	14,25	94,8
1	1,373	114,8	12,72	10,84	111,4
2	7,476	22,9	13,22	18,76	123,2
3	6,548	17,8	14,78	4,04	143,4
4	9,383	32,2	14,90	8,66	135,0
5.2	5,373	18,5	13,80	12,90	123,0
6.2	8,660	25,72	14,84	7,21	135,0

Agradecimentos

Os autores desejam expressar os seus agradecimentos ao CNPq e a FAPESP, pelo auxílio financeiro concedido.

Referências Bibliográficas

1. Bonatelli Jr., R. - Estabilidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ, 1977. (Tese de Mestrado).
2. Bonatelli Jr., R. - Parassexualidade e produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Piracicaba, ESALQ, 1981. (Tese de Doutorado).
3. Das, A. - Strain selection in citric acid fermentation: a review. Cur. Science, 41:593-596, 1972.
4. Doelger, W.P. & Prescott, S.C. - Citric acid fermentation. Indust. Eng. Chem., 26:1142-1149, 1934.
5. Gardner, J.F.; James, L.V. & Rubbo, S.D. - Production of citric acid by mutants of *Aspergillus niger*. J. Gen. Microbiol., 14:228-237, 1956.
6. James, L.V.; Rubbo, S.D. & Gardner, J.F. - Isolation of high acid yielding mutants of *Aspergillus niger* by a paper culture selection technique. J. Gen. Microbiol., 14:223-227, 1956.
7. Marier, J.R. & Boulet, M. - Direct determination of citric acid in milk with an improved pyridine - acetic anhydride method. J. Dairy Sci., 41:1683-1692, 1958.
8. Nehr, M.A. & Bonatelli Jr., R. - Efeitos do meio de cultura na produção de ácido cítrico em *Aspergillus niger*. Ciência e Cultura, 7 (Suppl.):667, 1981.
9. Pimentel, G.F. - Curso de estatística experimental. 3.ed. São Paulo, Piracicaba, 436p., 1966.
10. Raper, K.B. & Fennell, D.I. - The genus *Aspergillus*. Baltimore, William and Wilkins, 686p., 1965.

11. Siegel, S. - Estatística não-paramétrica para as ciências do comportamento. São Paulo, McGraw-Hill, 350p., 1975.
12. Silva, J.C. - Seleção de *Aspergillus niger* para produção de ácidos. Campinas, Universidade Estadual de Campinas, 1977. (Tese de Mestrado).
13. Silva, J.C. & Azevedo, J.L. - Radiação gama e instabilidade em *Aspergillus niger*. Rev. Microbiol., 9:156-158, 1978.
14. Silva, J.C. & Azevedo, J.L. - Utilization of gamma rays in the selection of *Aspergillus niger* for acid production. Rev. Brasil. Genet., 1:41-49, 1978.

DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AÇÃO BIOLÓGICA DO LI- POPOLISSACARÍDEO (LPS) DE CAMPYLOBACTER FETUS SS. JEJUNI*

Maria Regina Branquinho

Deptº de Microbiologia Médica
Instituto de Microbiologia UFRJ
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Celuta Sales Alviano

Deptº de Microbiologia Geral
Instituto de Microbiologia UFRJ

& Ilvan Delgado Ricciardi

Deptº de Microbiologia Médica
Instituto de Microbiologia UFRJ

Resumo

Foi estudado o lipopolissacarídeo (LPS) de *Campylobacter jejuni*. O método de extração utilizado proporcionou um lipopolissacarídeo de considerável pureza. A caracterização química do material revelou a ocorrência dos chamados açúcares basais glicose, galactose, hexosamina, ácido 2-ceto 3-deoxi D-octônico (KDO), além de ácido glicurônico e fosfato. No estudo da atividade biológica realizado em animais, uma DL₅₀ de 274 μ g em camundongos e o aparecimento das lesões características da reação de Shwartzman local, demonstraram claramente o potencial endotóxico do LPS de *C. jejuni*.

Summary

Chemical composition and biological action of lipopolysaccharide (LPS) of Campylobacter fetus ss. jejuni

The lipopolysaccharide of *Campylobacter jejuni* isolated from faeces of a patient presenting gastroenteritis was studied. The chemical characterization of the material showed that it is constituted by the so called basal sugars namely: glucose, galactose, hexosamine, 2-keto 3-deoxy D-octonic acid (KDO), and by glucuronic acid and phosphate. A DL₅₀ of 274 μ g for mice and the appearance of characteristic lesions of local Shwartzman reaction clearly demonstrated the endotoxic potential of the LPS of *C. jejuni*.

* Trabalho realizado no Deptº de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da UFRJ, com auxílio do CNPq e FINEP.

Introdução

Microrganismos do gênero *Campylobacter* são atualmente reconhecidos como importantes patógenos humanos, por estarem envolvidos em quadros septicêmicos (26), menin-gites (17, 33), artrites (2, 30) e infecções urinárias (5) entre outros, sendo, a subespécie *C. fetus ss jejuni* (*C. jejuni*) a de maior significado particularmente na área pediátrica pelo comprometimento do trato intestinal.

Apesar do pouco conhecimento acerca de sua fisiopatogenia, as manifestações clí-nicas provocadas por *C. jejuni* permitem que a infecção possa ser referida como uma gastroenterocolite. Além das observações sigmoidoscópicas de ulcerações e abscessos na mucosa intestinal de pacientes com gastroenterite, o frequente aparecimento de sangue e muco nas fezes sugere uma ação invasiva no intestino (3, 13, 14). Contudo, ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual o microrganismo se adere e destrói a membrana das células intestinais (11). Prováveis mecanismos de agressão tais como a produção de enterotoxinas e/ou a presença de fatores de colonização em mucosas não estão ainda bem estabelecidos em relação ao *C. jejuni* (9, 11). No entanto, é sabido que algumas patologias intestinais podem estar relacionadas à ação de outros mate-riais da superfície bacteriana, como é o caso da endotoxina (representada pelo li-polissacarídeo (LPS) de microrganismos da família *Enterobacteriaceae* (29, 32).

Este trabalho descreve a extração, purificação, caracterização e avaliação de al-guns efeitos biológicos do LPS de *C. jejuni*.

Material e Métodos

Cepa bacteriana - A cepa de *Campylobacter jejuni* foi isolada de fezes de uma crian-ça portadora de gastroenterite, na cidade do Rio de Janeiro (21).

Cultivo e colheita do organismo - *C. jejuni* foi cultivada em 5ml de caldo nutritivo (Brucella Broth, Difco Detroit, MI, USA), até a obtenção de uma suspensão de absor-bância (A540) 1,7. Essa suspensão foi semeada em placas com agar sangue, sendo a base o Agar Brucella (Difco), suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carnei-ro. A incubação foi feita em atmosfera de 5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂ a 37°C por 24 horas. A massa celular de cada placa foi colhida assepticamente com 5ml de solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,02M, pH 7.4, e lavada 3 vezes.

Isolamento do LPS - As células íntegras de *C. jejuni* foram tratadas com fenol aquoso a 45% (w/v) segundo Westphal & Jann (31). Após a 3ª extração, tanto as fases aquosas como as fenólicas foram centrifugadas a 10.000g durante 1 hora e, os sobrenadantes, dialisados por 3 dias contra água destilada foram tratados com acetona (3 vol.) a 4°C na presença de traços cloreto de magnésio (Difco). Após 2 horas a 4°C, o precipitado obtido por centrifugação a 5.000g por 10 minutos foi dissolvido em tampão Tris (hidroximetilmetano) 0,025M pH 7.5 e a solução dialisada contra o mesmo tampão durante 18 horas. A fração não dialisável depois de ser tra-tada com 15mg/ml de RNase pancreática bovina (Sigma) e 1mg/ml de DNase pancreática (Sigma) por 18 horas a 37°C sob agitação, foi centrifugada a 4.000g por 1 hora. O sobrenadante foi submetido a centrifugação a 100.000g. Os sedimentos foram tratados com 30ml de ureia 6M, lavados com água destilada e liofilizados.

Endotoxina padrão - Uma preparação comercial da endotoxina de *Escherichia coli* O₁₁₁B₄, foi obtida do Laboratório Difco.

Caracterização química do LPS - a) *Varredura espectrofotométrica* - Ambas as fases, aquosa e fenólica, foram submetidas à varredura na faixa entre 300 a 190nm (Spec-trofotometer Acta C-111 Beckman); b) *Análises quantitativas* - Métodos colorimétri-coes padrões foram utilizados nas seguintes determinações: proteínas pelo método de Lowry & col. (15); ácidos nucléicos pelo método de Dische (6); fosfatos pelo método de Ames (1); nitrogênio pelo método de Schiffman (23); carboidratos totais pela reação do fenol-ácido sulfúrico (8); ácido 2-ceto 3-deoxi D-octônico (KDO) pela reação do ácido tiobarbitúrico (28); metil pentoses pelo método de Dische & Shet-

ties (7); hexosaminas pelo método de Johnson & col. (12); c) Determinação dos monossacarídeos neutros - Ácúcares neutros foram identificados e quantificados por cromatografia líquido-gás (g.l.c.) dos seus derivados alditol acetatos obtidos após hidrólise do LPS com ácido trifluoracético (TFA) 6N, de acordo com a técnica de Sawardeker & col. (22). A cromatografia foi feita em coluna (6ft x 1/8in) contendo neopentilglicolsuccinato (NPGS) 3% em 100/120 gáschrom Q a 200-215°C, utilizando-se cromatógrafo de fase gasosa (Varian Aerograph série 2.400). Os picos foram identificados pela comparação com os tempos de retenção de padrões acetilados; d) Determinação dos açúcares ácidos - Foram determinados segundo a técnica descrita por Taylor & Conrad (25), utilizando-se carbodiimida solúvel em água (Sigma Chemical Company, MO, USA). Os derivados alditol acetatos foram determinados pela g.l.c., nas condições acima descritas; e) Determinação de compostos aminados - O LPS, após hidrólise com ácido clorídrico 6N por 18 horas, a 100°C, foi seco em concentrador à vácuo e lavado 3 vezes com 1ml de água destilada. Os aminoácidos foram analisados por cromatografia de troca iônica em analisador de aminoácidos ("Beckman model 120C") segundo método de Spakman & col. (23), modificado por Piez & Morris (19).

Caracterização biológica do LPS - a) Letalidade para camundongos (DL_{50}) - Camundongos de 4 a 6 semanas pesando de 27 a 30g foram divididos em grupos de 6 animais e inoculados intraperitonealmente com solução aquosa de LPS variando de 500 a 62,5 μ g/ml. O número de mortos foi registrado após 48 horas de observação e a DL_{50} calculada pelo método de Reed & Muench (20). Paralelamente foram realizados testes com LPS de *E. coli* O₁₁₁B₄ (Difco), *E. coli* O₁₄ e *Yersinia enterocolitica* O₃ (extraídos e purificados, conforme o procedimento descrito anteriormente); b) Reação de Shwartzman local - Coelhos brancos pesando de 2 a 2,5Kg foram inoculados intradermicamente com soluções de LPS variando de 300 a 1 μ g/0,1ml em vários locais do dorso depilado e após 18 horas desafiados endovenosamente com 10 μ g/ml de LPS de *E. coli* O₁₁₁B₄. Coelhos que desenvolveram as típicas lesões do fenômeno 4 horas após à dose desencadeante, tiveram os resultados positivos. Foram realizados testes com LPS de *C. jejuni* e *Y. enterocolitica* O₃.

Resultados

A composição química do LPS de *C. jejuni* é apresentada na Tabela 1. O LPS de *C. jejuni* foi evidenciado somente na fase aquosa, sendo o rendimento do método da ordem de 0,5% (w/v) da massa celular processada. A ausência de absorção a 260nm na varredura espectrofotométrica sugeriu estar a preparação livre de ácidos nucleicos, o que foi confirmado pela baixa porcentagem (0,5%) obtida na técnica de Dische. O conteúdo de proteína foi de 1,5%; a hidrólise ácida do LPS e posterior cromatografia de troca iônica, revelou a presença de 16 aminoácidos (3,75%) apresentando-se em maiores proporções a alanina (0,509%), glicina (0,621%), lisina (0,353%) e ácido aspártico (0,247%); os demais estavam presentes apenas em traços.

A hidrólise ácida do LPS e posterior g.l.c. revelou ser a porção polissacarídica do LPS constituída de 2 açúcares neutros: galactose e glicose, presentes quase na mesma proporção; o açúcar ácido detectado foi o ácido glicurônico. Não foram encontrados metilpentoses. Os resultados apresentados pela combinação de colorimetria e g.l.c. demonstraram a presença de glicose, galactose, ácido glicurônico, KDO, hexosamina (provavelmente glicosamina), fosfato e aminoácidos em hidrolisado do LPS. A letalidade (DL_{50}) para camundongos de cada uma das preparações de LPS é apresentada na Tabela 2.

Os resultados da reação de Shwartzman local induzida pelos LPS de *C. jejuni* e *Y. enterocolitica* O₃ estão representados na Tabela 3. Com esse teste ficou demonstrado ter o LPS de *C. jejuni* menor toxicidade que o de *Y. enterocolitica* O₃.

Discussão

As endotoxinas extraídas de microrganismos pertencentes a certos gêneros da família Enterobacteriaceae contêm como componentes característicos, o ácido 2-ceto

3-deoxi D-octônico (KDO), heptose e lipídeo. Além desses, apresentam açúcares como glicose, galactose, hexosaminas, 6-deoxyhexose e di-deoxyhexoses (16). A análise química do LPS de *C. jejuni* obtido na fase aquosa do processo de extração utilizou revelou a presença de glicose, galactose, KDO, hexosamina, fosfato e proteínas. Apesar de ainda não termos caracterizado o componente lipídico da molécula, a hidrólise ácida desse LPS liberou componentes glicídicos e um precipitado insolúvel, presumivelmente lipídeo A. O ácido glicurônico encontrado pode ser considerado como um componente covalentemente ligado ao LPS, pois a purificação desse material, através, principalmente de ultracentrifugações sucessivas, não permitiria a determinação desses ácidos no LPS, se fossem eles somente provenientes de uma incompleta dissolução do material capsular.

Sendo o antígeno O da cepa de *C. jejuni* estudo constituído só dos chamados açúcares basais (glicose, galactose, KDO, hexosamina) e ácido glicurônico, não possibilite talvez um número muito grande de sorotipos dentro dessa espécie. Evidentemente, maiores especulações nesse campo só poderão ser feitas após a continuidade dos estudos relativos à composição do antígeno O e de estudos sorológicos profundos com grande número de amostras de *C. jejuni*.

As numerosas atividades endotóxicas dos lipopolissacarídeos tais como, pirogenicidade, letalidade em animais, reação de Shwartzman local e generalizada, alterações no quadro hematológico e imunológico e choque entre outras, são atribuídas à porção lipídica (lipídeo A) dessa estrutura (10). A toxicidade do LPS extraído do *C. jejuni* foi estudada "in vivo" através da reação de Shwartzman local em coelhos e pela determinação da DL₅₀ em camundongos. A DL₅₀ de 274 µg obtida para o LPS de *C. jejuni* demonstra marcada potencialidade endotóxica desse material, pois esse valor se situou bem próximo daqueles obtidos com lipopolissacarídeos de outros enteropatógenos clássicos, como o de 250 µg para o LPS de *E. coli* O₁₄, 225 µg para o LPS de *Y. enterocolitica* O₃ e 230 µg para o LPS de *E. coli* O₈ (18). A obtenção de regiões necrosadas e hemorrágicas características da reação de Shwartzman local, induzida pelo LPS de *C. jejuni*, revela claramente o potencial endotóxico desse constituinte da parede celular, se bem que a dose mínima necessária para a produção de lesões (50 µg) é bem superior a mínima necessária para a indução da reação com o LPS de *Y. enterocolitica* O₃ (5 µg).

Apesar de ainda não termos caracterizado quimicamente o constituinte do lipopolissacarídeo responsável pela atividade biológica, é possível especular sobre a endotoxicidade do LPS de *C. jejuni* em função dos resultados obtidos nos testes biológicos; eles apresentaram uma similaridade entre esse LPS e os extraídos de outros

Tabela 1 - Composição química do lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Campylobacter jejuni*

Componentes	%
Carboidratos totais	41,60
metil pentose	0,00
glicose	5,73
galactose	5,17
ácido glicurônico	1,64
Hexosamina	2,20
KDO	6,70
Proteínas totais	1,50
Ácidos nucleicos	0,50
Aminoácidos	3,75
Fosfatos	3,48
Nitrogênio	3,00

KDO, ácido 2-ceto 3-deoxi D-octônico.

Tabela 2 - DL₅₀ observada em camundongos inoculados com preparações de lipopolissacarídeo (LPS) de diversas origens

LPS	DL ₅₀ (µg)*	Peso dos animais	DL ₅₀ (µg/g)
<i>C. jejuni</i>	274	30	9,13
<i>E. coli</i> O _{11:B4}	181	30	6,33
<i>E. coli</i> O ₁₄	250	30	8,33
<i>Y. enterocolitica</i> O ₃	225	27	4,63

* Calculada pelo método de Reed & Muench (20).

enteropatogênicos.

Se confirmarmos os resultados obtidos por Butzler & Skirrow que demonstraram experimentalmente a invasão de mucosa intestinal pelo *C. jejuni* em pintos (4), logicamente a toxicidade de seu LPS contribuiria para a severidade da infecção entérica.

Tabela 3 - Resultados observados na indução da reação de Shwartzman local em coelhos inoculados com lipo-polissacarídeo (LPS) de *Campylobacter jejuni* e *Yersinia enterocolitica* O₃

LPS	% de animais com reações positivas *							
	300 μ g	150 μ g	100 μ g	50 μ g	10 μ g	5 μ g	1 μ g	salina
<i>C. jejuni</i>	100	100	100	100	0	0	0	0
<i>Y. enterocolitica</i> O ₃	100	100	100	100	100	100	0	0

* Dose desencadeante: 10 μ g de LPS de *E. coli* O₁₁₁B₄ inoculados por via endovenosa.

Referências Bibliográficas

1. Ames, B.N. - Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Meth. Enzymol.*, 88:115-118, 1966.
2. Bekassy, A.N.; Enell, H. & Schalen, C. - Severe polyarthritides following *Campylobacter enteritis* in 12 years-old boy. *Acta Pediatric Scand.*, 69:269-271, 1980.
3. Blaser, M.J.; Berdowitz, I.D. & La Force, M. - *Campylobacter enteritis*: clinical and epidemiologic features. *Ann. Intern. Med.*, 91:179-185, 1979.
4. Butzler, J.P. & Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*. *Clin. Gastroenterol.*, 8:737-765, 1979.
5. Davies, J.S. & Penfold, J.B. - *Campylobacter* urinary infection. *The Lancet*, I, May 19, 1979.
6. Dishe, Z. - Determination of nucleic acids in tissues by pentoses analysis. In: - Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds.- *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, Vol. III, p. 680-681, 1957.
7. Dishe, Z. & Shettles, L.B. - A specific color reaction of methylpentoses and a spectrophotometric micromethod for their determination. *J. Biol. Chem.*, 175:595-600, 1948.
8. Dubois, M.; Gilles, K.A.; Hamilton, J.K.; Rubers, P.A. & Smith, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356, 1965.
9. Field, L.H.; Underwood, J.L.; Pope, L.M. & Berry, L.J. - Intestinal colonization of neonatal animals by *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Inf. Immun.*, 33:884-892, 1981.

10. Galanos, C. - Chemical, physicochemical and biological properties of bacterial LPS. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 29:321-332, 1979.
11. Guerrant, R.L.; Lahita, G.R.; Winn, W.C. & Roberts, R.B. - *Campylobacter* in man: pathogenic mechanism and review of 91 bloodstream infections. *Amer. J. Med.* 65:584-592, 1978.
12. Johnson, A.R. - Improved method of hexosamine determination. *Anal. Biochem.*, 44:628-635, 1971.
13. Lambert, M.E.; Tischer, M.E.; Karmali, M.A. & Newman, A. - *Campylobacter ileocolitis*: an inflammatory bowel disease. *Can. Med. Ass. J.*, 121:1377-1379, 1979.
14. Loss, R.W.; Mangla, J.C. & Pereira, M. - *Campylobacter colitis* presenting as inflammatory bowel disease with segmental colonic ulcerations. *Gastroenterology*, 79:138-140, 1980.
15. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
16. Inderitz, O.; Westphal, O.; Staub, A.M. & Nikaido, H. - Isolation and chemical and immunological characterization of bacterial lipopolysaccharides. In:- Weinbaum, G.; Kadis, S. & Ajl, S.J., eds. - *Microbiol toxins*. New York, Academic Press, V. 4, chap. 4, p. 145-233, 1971.
17. Norrby, R. & Mc Closkey, R.V. - Meningitis caused by *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. *Brit. Med. J.*, 280:1164, 1980.
18. Nowotny, A. - Chemical and biological heterogeneity of endotoxins. In:- Weinbaum, G.; Kadis, S. & Ajl, S.J., eds. - *Microbiol toxins*. New York, Academic Press, V. 4, chap. 7, p. 309-329, 1971.
19. Piez, K.A. & Morris, L. - A modified procedure for automatic analysis of aminoacids. *Anal. Chem.*, 1:187-201, 1960.
20. Reed, L.J. & Muench, H. - A simple method of estimating 50% end points. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
21. Ricciardi, I.D.; Ferreira, M.C.S.; Otto, S.S.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Fontes, C.F. - Thermophilic *Campylobacter* associated diarrhoeae in Rio de Janeiro. *Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol.*, 22:189-191, 1979.
22. Sawardeker, J.S.; Sloneker, J.H. & Jean, E.A. - Quantitative determination of monosaccharides as their acetates by gas liquid chromatography. *Anal. Chem.*, 37:1602-1604, 1965.
23. Schiffman, G.; Kabat, E.A. & Thompson, W. - Immunochemical studies on blood groups. XXX - Cleavage of A, B and H blood-group substances by alkali. *Biochemistry*, 3:113-120, 1964.
24. Spackman, D.H.; Stein, W.H. & Moore, S. - Automatic recording apparatus for use in chromatograph of aminoacids. *Anal. Chem.*, 30:1190-1206, 1958.
25. Taylor, R.L. & Conrad, H.E. - Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, 11:1383-1386, 1972.
26. Torphy, D.E. & Bon, D.W.W. - *Campylobacter fetus* infection in children. *Pediatrics*, 64:898-903, 1979.

27. Véron, M. & Chatelain, R. - Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species, *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. Inst. J. Syst. Bacteriol., 23:122-134, 1973.
28. Weissbach, A. & Hurwitz, J. - The formation of 2 keto-3-deoxyheptonic acid in extracts of *E. coli*. B. J. Biol. Chem., 234:705-709, 1959.
29. Weinbaum, G.; Kadis, S. & Ajl, S.J. - Microbiol toxins. New York, Academic Press, V. 4, p. 473, 1971.
30. Weir, W.; Keat, A.C.; Weslsby, P.D. & Brear, G. - Reactive arthritis associated with *Campylobacter* infection of the bowel. J. Infect., 1:281-284, 1979.
31. Westphal, O. & Jann, K. - Bacterial lipopolysaccharides extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In: - Whistler, R.L. & Walfran, M.L., eds. - Methods in carbohydrates chemistry. New York, Academic Press, Vol. 5, p. 83-89, 1965.
32. Wolff, S.M. - Biological effects of bacterial endotoxins in man. J. Infect. Dis., 128:259-264, 1973.
33. Wright, E.P. - Meningism associated with *Campylobacter jejuni enteritis*. The Lancet, I: May 19, 1979.

ESTUDO DO AGENTE ETIOLÓGICO DO "ERITRASMA". I - CARACTERIZAÇÃO DOS DIFTERÓIDES FLUORESCENTES

Luiz Carlos D. Formiga

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

Leila Maria M. Vieira

Faculdade de Ciências Médicas UERJ
R. Prof. Manuel de Abreu, 48
20550 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Tania Ludimila de Assis

Clinica Dermatológica
Faculdade de Medicina UFRJ
Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

& Ítalo Suassuna

Faculdade de Ciências Médicas UERJ

Resumo

Foi realizado estudo bacteriológico com o agente etiológico do eritrasma. Os resultados obtidos indicam que sob o ponto de vista bioquímico o *C. minutissimum* corresponde a um grupo complexo. Todas as amostras estudadas foram enquadradas nos biotipos propostos por diversos autores para esse microorganismo; até três tipos diferentes de difteróides fluorescentes foram isolados do mesmo paciente; em alguns casos difteróides de fluorescência rósea foram isolados juntamente com aqueles de fluorescência vermelho coral. Pelas características bioquímicas observadas neste trabalho, conclui-se que o agente do eritrasma é semelhante a diferentes espécies de *Corynebacterium* anteriormente descritas. Propõe-se um esquema de grupagem simples com 5 biotipos.

Summary

Studies on the causative organism of "erythrasma". I - The characterization of fluorescent diphtheroids

A study of microorganism causing erythrasma was carried out. Evidence was produced indicating that, *C. minutissimum* has the biochemical characteristics of a complex microbial group but that all of the strains could be included in groups already described; that up to 3 different types of fluorescent diphtheroids could be isolated from the same patient; that pink-fluorescent diphtheroids were also

isolated with coral-red fluorescent bacilli; that bases on its biochemical characteristics, the causative agent of erythrasma can be classified in classical species of *Corynebacterium*. A simple classification in five group are described.

Introdução

Desde que Sarkany & col. (15) propuseram etiologia bacteriana para o eritrasma (*C. minutissimum*), alguns autores estudaram a atividade bioquímica deste difteróide.

Embora Sarkany & col. (16) descrevessem o microrganismo com um comportamento bioquímico definido, os difteróides isolados de lesões de eritrasma, por outros autores, apresentaram atividade bioquímica variável, permitindo a suposição de que a nova espécie envolvesse uma variedade de bastonetes fluorescentes (3, 12, 18, 19).

A possibilidade de formar grupos com bastonetes corineiformes pode ser observada em trabalhos diversos. Evans (6) apoiada em cinco testes de laboratório, organizou esquema de classificação que possibilitou a divisão desses difteróides em sete grupos (biotipos). Utilizou testes de fermentação de glicose, maltose, sacarose, redução de nitrato e hidrólise da uréia. As amostras de três dos seus sete biotipos não corresponderam a qualquer das espécies descritas por Breed & col. (2) de acordo com seus comentários críticos. Holt (9) adicionou dois testes, produção de acetoina e hidrólise de gelatina, e conseguiu ampliar para quinze o número de grupos (biotipos). Somerville (19) desprezou alguns dos testes propostos por Evans (6) e Holt (9) e introduziu a pesquisa de fluorescência e a atividade lipofílica e lipolítica. Trabalhando apenas com difteróides isolados da pele, definiu quinze biotipos diferentes, sete fluorescentes e oito não fluorescentes. De acordo com Marples (11) a lipofilia seria uma característica importante para a divisão desses microrganismos porque refletiria a sua atividade "in vivo". Entretanto, no trabalho de Somerville (19) somente 3% das amostras lipofílicas foram isoladas da pele da testa, onde a concentração de lipídeos é muito alta. Este fato leva-nos a questionar se a atividade lipofílica "in vitro" corresponderia à atividade "in vivo".

Segundo Somerville (19) seu esquema de classificação parece permitir resultados que podem ser ecologicamente expressivos, embora não reflita basicamente diferenças fundamentais entre as amostras. A grupagem por testes simples e aplicáveis em um grande número de amostras seria vantajoso, embora estudos adicionais fossem necessários. Nesse sentido a análise sorológica poderia ser proveitosa sob o ponto de vista de identificação específica. O meio de agar chocolate telurito (ACT) mostrou ser de grande eficácia quando comparado aos meios de Pai, Mueller-Hinton e TC-199 (*). Nesse meio (ACT) desenvolveram-se tipos coloniais diferentes de difteróides fluorescentes ou não, a partir da mesma lesão, ou ainda, de indivíduos aparentemente sadios. O meio B de King foi considerado como uma alternativa na evidenciação da fluorescência vermelho-coral em complementação ao meio ACT (7), uma vez que neste não se observa a fluorescência. Outras corinebactérias descritas anteriormente ao *C. minutissimum* são também fluorescentes (19). O objetivo deste trabalho é estudar as características bioquímicas desses difteróides fluorescentes isolados de eritrasma e de indivíduos sadios e tentar classificá-los entre as diferentes espécies de *Corynebacterium* já descritas.

(*) Formiga, L.C.D.; Assis, T.L. & Suassuna, I. - Comparação de meios de cultura para o isolamento do *Corynebacterium minutissimum* dos espaços interdigitais dos pés. An. Bras. Dermatol. (a ser publicado).

Material e Métodos

Estípites bacterianas - a. Cinquenta e cinco amostras de difteroides fluorescentes (vermelho-coral, alaranjado), identificadas como *C. minutissimum*, isoladas de trinta e seis indivíduos, sendo que quinze deles possuíam lesões fluorescentes; quatorze com lesões não fluorescentes, mas nas quais não se caracterizou dermatófitos ou *Candida* sp., e de sete indivíduos sadios, cujo material foi colhido a nível do 4º espaço interdigital de um dos pés; *b.* Amostras-tipo referidas na Tabela 1, escolhidas principalmente entre aquelas de origem humana; *c.* Conservação das amostras, em "Cystine Trypticase Agar-BBL" (CTA) à temperatura ambiente, renovando-se o repique a cada 90 dias (8).

Caracterização bioquímica - Os testes bioquímicos foram escolhidos entre aqueles utilizados para a biotipagem de difteroides (6, 9, 12, 19) e entre os de identificação específica das corinebactérias (2, 4, 8, 14). *a. Testes de fermentação -* Os testes de utilização de carboidratos foram realizados em CTA contendo 1% do substrato-teste (glicose-Fisher, maltose-Fisher, sacarose-Fisher, amido solúvel-Merck, galactose-Gurr e frutose-BBL). A incubação foi em aerobiose, à temperatura de 37°C. O inóculo correspondeu a uma alçada (+ 4mm de diâmetro) de um cultivo com 24 horas no meio básico (CTA sem carboidrato). A leitura foi realizada durante 7 dias, anotando-se os resultados diariamente; *b. Teste de fermentação de glicose -* Foi realizado seguindo a orientação de Hugh & Leifson (10) a partir de uma cultura de 24 horas em "Brain Heart Infusion Agar" (Difco). A incubação e a leitura foram feitas nas condições anteriores; *c. A pesquisa de atividade ureásica, foi realizada no meio de Christensen utilizando inóculo abundante a partir de uma cultura de 24h em "Brain Heart Infusion Agar" (Difco). Os cultivos foram examinados após 4h de incubação sendo as culturas negativas observadas diariamente durante 5 dias; d. A pesquisa de catalase foi feita no meio que serviu para a retirada do inóculo do teste anterior; e. Redução de nitrato a nitrito - De acordo com a técnica usual e descrita por Bier (1); f. A pesquisa de fluorescência sob lâmpada ultravioleta (375nm) foi realizada no meio B de King (5, 7) distribuído em placas de Petri de 90mm de diâmetro, em volume de 20ml. A inoculação foi feita a partir de cultura de 24h em meio CTA (BBL) fazendo-se estrias na superfície do agar. Após incubação durante 24h o cultivo foi iluminado com lâmpada UV em câmara escura, anotando-se o resultado como negativo após o 4º dia de incubação (7); g. Comportamento em presença de "tween 80" (19) efetuada em agar nutritivo (Oxoid) e agar nutritivo contendo 1% de "tween 80". A inoculação foi feita a partir de diluição adequada de cultura com 24h no meio básico fazendo-se estrias na superfície do agar, afim de obter-se colônias isoladas. Após incubação durante 48h anotou-se o resultado da atividade lipofílica ou inibição do crescimento, enquanto que a atividade lipolítica foi observada com 72h.*

Tabela 1 - Características bioquímicas de amostras-padrão de *Corynebacterium*

Espécie	Teste	Fluoresc.				
		Glicose	Maltose	Sacarose	Nitrato	Ureia
<i>C. diphtheriae</i> (NCIC 3985)	A	A	-	+	-	+
<i>C. xerosis</i> (ATCC 373)	A	A	A	+	-	+
<i>C. minutissimum</i> (NCIC 10288)	A	A	A	-	-	+
<i>C. striatum</i> (ATCC 6940)	A	A	A	+	-	+
<i>C. renale</i> (ATCC 19412)	A	-	-	-	+	+
<i>C. equi</i> (ATCC 7698)	-	-	-	+	+	-
<i>C. haemolyticum</i> (ATCC 7005)	-	-	-	+	+	-

A = reação ácida; (-) = reação negativa; (+) = resultado positivo.

Resultados

A Tabela 1 apresenta os resultados das amostras-padrão. Observamos comportamento idêntico entre as espécies *C. equi* e *C. hoagii* de um lado e *C. xerosis* e *C. striatum* do outro. Com as outras amostras observou-se em comum apenas a fluorescência. Os resultados do comportamento das 55 amostras de difteroides fluorescentes são apresentados na Tabela 2. Em relação à pesquisa de fluorescência dos difteroides no meio B de King, foram estudadas cinqüenta e duas amostras (foram excluídas 3 amostras catalase negativas), que apresentaram no "TC-medium 199" fluorescência vermelho-coral em trinta e sete ocasiões, alaranjada sete vezes e rósea oito vezes. Das amostras com fluorescência vermelho-coral apenas duas forneceram resultados inferiores no meio B de King em comparação com o "TC-medium 199". As de fluorescência alaranjada comportaram-se de modo semelhante e as oito amostras róseas apresentaram fluorescência vermelha no meio de King.

Tabela 2 - Características bioquímicas das 55 amostras de difteroides fluorescentes isolados de lesões de eritrasma e de indivíduos aparentemente saudáveis

Nº da amostra	Teste	Glicose e Frutose				Redução de Nitrato	Hidrólise da Uruca	Comportamento em meio com "Tween 80"			Identificação provável ***
		Maltose	Sacarose	Galactose	LpL			LpL	LpF.	Inib.	
20, 32, 34	A	A	A	A	2/3	-	2/3	-	1/3	-	<i>C. xerosis</i>
2, 9	A	-	A	A	-	-	1/2	-	1/2	-	<i>C. striatum</i>
48	A	A	-	A	-	*	1	-	-	-	<i>C. bovis</i>
4, 8, 12, 15, 16, 18, 27, 28, 29, 35, 36, 38, 43, 44, **46, 47, 51, 52, 54, 55	A	A	A	-	9/20	2/20	6/20	11/20	3/20	-	<i>C. xerosis</i>
3, 23, 31, 33, 29, 41*, 53	A	A	-	-	1/7	1/7	1/7	2/7	4/7	-	<i>C. bovis</i>
19, 25	A	-	A	-	-	-	1	-	1	-	<i>C. striatum</i>
5, 6, 10, 24, 26, 40*	A	-	-	-	2/6	-	2/6	3/6	1/6	-	<i>C. xerosis</i>
7, 11, 13, 14, 17, 21, 22, 30, 37*, 42, 45, 49, 50, 56	-	-	-	-	2/14	-	7/14	1/14	6/14	-	<i>C. hoagii</i>

LpL = atividade lipolítica; LpF = atividade lipofílica; Inib. = inibição de crescimento (parcial); A = reação ácida.

(*) = amostras catalase negativas; (***) ácido à partir de amido
(***) baseada nos resultados das amostras padrão (Tabela 1) e na literatura disponível.

A Tabela 3 permite observar biotipos diferentes de difteroides fluorescentes isolados do mesmo paciente, com base nos esquemas de classificação propostos por Evans (6), Holt (9) e Somerville (18). Entre as amostras que possuem comportamentos muito similares há a possibilidade do encontro de pelo menos um resultado diverso. Deste modo se fizeram notar os resultados do teste de comportamento em presença do "tween 80" entre aquelas de resultados semelhantes (caso 1199).

Em quatro outras oportunidades encontramos amostras com dois testes de resultados diversos e onde se expressa mais uma vez, em maior número, a análise do comportamento em presença de "tween 80" que se somou a um dos outros testes (casos 1014, nitrato; 1403, sacarose; 1161, catalase e 1191, sacarose e catalase). Nos casos restantes (931, 1253c e 967) as diferenças foram mais acentuadas.

Na Tabela 4 procuramos grupar os microrganismos catalase positivos tomando como base apenas três testes de fermentação (glicose, maltose e sacarose) porque a mesma abordagem fora anteriormente indicada para os difteróides não fluorescentes de origem humana (8).

Tabela 3 - Tipos de difteróides fluorescentes isolados do mesmo paciente

Nº do ca- so e de amostras	Teste	Comportamento						Grupos de Evans	Somerville	Holt
		Glicose	Maltose	Sacarose	em "Tween 80"	Redução nitroso	hidrolise da uréia			
931	(4)	A	A	-	LpL	-	-	D	2	4
	(5)	A	-	-	Inib.	+	-	(..)	2	5
1041	(12)	A	A	A	LpF	+	+	(..)	3	2
	(11)	-	-	-	LpF	-	-	G	7	13
	(13)	-	-	-	Inib.	+	-	(..)	7	15
1158	(16)	A	A	A	LpF	+	-	A	3	1/6
	(18)	A	A	A	Inib.	+	-	A	3	1/6
	(17)	-	-	-	LpF	-	-	G	7	13
1195	(28)	A	A	A	LpF	-	-	D	4	4
	(29)	A	A	A	LpL	-	-	D	2	4
	(30)	-	-	-	LpF	+	-	(..)	7	15
1199	(32)	A	A	A	LpF	+	-	A	3	1/6
	(34)	A	A	A	Inib.	+	-	A	3	1/6
	(31)	A	A	-	Inib.	+	-	C	3	7/8
	(33)	A	A	-	Inib.	-	-	P	5	5/11
1225	(39)	A	A	-	Inib.	-	-	P	5	5/11
	(41)§	A	A	-	LpL	-	-	P	8	5/11
	(40)§	A	-	-	LpL	-	-	D	8	(..)
1253	(44)	A	A	A	Inib.	-	+	E	4	3
	(45)	-	-	-	Inib.	-	-	G	7	13
1403	(54)	A	A	A	LpL	-	-	P	2	4
	(53)	A	A	-	LpF	-	-	P	5	5/11
967	(8) (*)	A	A	A	LpF	-	-	D	4	4
	(7)	-	-	-	Inib.	-	-	G	7	13
1161	(21) (*)	-	-	-	Inib.	-	-	G	7	13
	(22)	-	-	-	LpF	-	-	G	7	13
1191	(25) (*)	A	-	A	LpL	-	-	D	6	(..)
	(26)	A	-	-	LpL	-	-	D	6	(..)

(*) = indivíduos aparentemente sadios; LpL = atividade lipolítica; LpF = atividade lipofílica; Inib. = inibição parcial do crescimento; A = reação ácida; § = amostras negativas; (..) = tipos não encontrados pelos autores.

Discussão

Comportamento bioquímico diverso dos difteróides fluorescentes isolados de eritrotrama ou de indivíduos aparentemente sadios foi anteriormente descrito (3, 12). A grande versatilidade bioquímica desses microrganismos tem dificultado a formação de um esquema de diferenciação que permita incluir novas amostras.

Alguns dos microrganismos aqui estudados não poderiam ser classificados entre os biotipos propostos por Evans (6) ou Holt (9), mas todas se enquadram num dos grupos de Somerville (19). Por outro lado, não encontramos entre nossas amostras nenhuma pertencente ao biotipo 1 da autora, o que não é de todo estranho porque nos seus trabalhos representa o grupo menos encontrado.

Os resultados da Tabela 3 podem documentar o grau de dificuldades no sentido de grupagem, em decorrência da óbvia versatilidade bioquímica destes microrganismos e, ainda, apresentar dados aparentemente originais - o encontro de tipos diferentes de difteróides fluorescentes a partir do mesmo paciente ou de indivíduos aparentemente sadios. Se considerarmos os esquemas de classificação de Evans (6) ou Holt (9), pelo menos três biotipos diferentes podem ser considerados (caso 1199), embora, apenas dois biotipos fossem encontrados se respeitada a proposta de Somerville (19).

Entretanto, se levar-se em conta o comportamento frente ao "tween 80" e o teste de redução de nitrato como indicadores de grupos diferentes, no mesmo caso, quatro biotipos diversos podem ser considerados.

Em outras oportunidades pode ser anotado que o esquema de Somerville (19), que no caso acima referido conseguiu reduzir o número de biotipos encontrados no mesmo paciente, agora pode ser utilizado com finalidade oposta. No caso 1195 foram isolados difteróides pertencentes a três diferentes biotipos de Somerville (19) e que seriam referidos apenas como dois biotipos de acordo com Holt (9) onde teríamos os biotipos 4 e 15 e com Evans (16) o biotipo D. Este esquema mais recente apresenta a desvantagem de colocar em biotipos diferentes amostras que apresentam uma atividade bioquímica semelhante e ainda de colocar no mesmo biotipo amostras com atividades diferentes. No exame 1195 (Tabela 3) observa-se que as amostras 28 e 29 do mesmo biotipo de Evans (6) ou de Holt (9) são colocadas em biotipos diferentes seguindo a orientação de Somerville (19). De modo inverso as amostras 4 e 5 do caso 931 (Tabela 3) são colocadas no mesmo biotipo.

A impossibilidade de classificar algumas amostras pelo esquema de Evans (6) e pelo de Holt (9) indicam a insuficiência dos dois esquemas. Essas amostras podem ser encontradas na Tabela 3 casos 931, 1014, 1195, 1225, 1191. As demais na Tabela 2, números 10, 48, 49 quando consideramos Evans (6) e 2, 6, 9, 19 e 24 para Holt (9). Somerville (19) e Holt (9) não procuraram fazer uma correspondência com as espécies de *Corynebacterium* anteriormente descritas. Fizemos esta correspondência e ainda correlacionamos os grupos desses pesquisadores aos nossos resultados, com amostras múltiplas do mesmo paciente, com objetivo principal de demonstrar a possibilidade de isolar da mesma lesão biotipos diferentes de difteróides fluorescentes, o que poderá ter implicações na conduta terapêutica. De maneira arbitrária resolvemos valorizar os testes de fermentação da glicose, maltose e sacarose para formar cinco biotipos bioquimicamente diferentes (Tabela 4), de modo a atender uma triagem rápida laboratorial.

As amostras-padrão do *Corynebacterium* (Tabela 1) à semelhança do *C. minutissimum* (NCIC 10288), são capazes de produzir a mesma fluorescência dos difteróides aqui estudados, estes resultados ampliam os de Somerville (19). Surge assim, a possibilidade de classificar os difteróides entre as espécies do gênero *Corynebacterium* relacionadas no Manual de Bergey (14).

Considerando a espécie *C. xerosis* como: a) capaz de fermentar glicose, maltose e sacarose (2, 12); b) de comportamento variável em relação ao nitrato, porque embora seja referido como nitrato positivo em Rogosa & col. (14), é negativo para Breed & col. (2) e Smith & col. (17), poderemos assim tentar relacionar com essa espécie uma grande parte dos difteróides fluorescentes. Na Tabela 2 são as amostras de número 20, 32, 34 e ainda as de número 4 à 55, com exceção de duas que hidrolizaram uréia.

Tabela 4 - Biotipos de difteróides fluorescentes

Grupo (*)	Nº de amostras	Testes			Grupos de Somerville 1973 (19)	Nº de amostras (**)
		Glicose	Maltose	Sacarose		
I	23	A	A	A	2	5
					3	9
					4	9
II	7	A	A	-	3	1
					5	6
III	4	A	-	A	6	4
IV	5	A	-	-	2	2
					6	3
V	13	-	-	-	7	13

(*) = não foram incluídas amostras catalase negativas; A = reação ácida; (-) = reação negativa; (**) = número de amostras encontradas nos grupos de Somerville.

Até a sétima edição do Manual de Bergey (2) era relativamente fácil diferenciar *C. xerosis* de *C. striatum* pelo crescimento aeróbio estrito da segunda espécie, e que excluia o seu teste de patogenicidade para animal de laboratório. Entretanto, *C. striatum* está relacionado na nova edição (14) como de tipo respiratório facultativo. No teste de redução de nitrato, o *C. striatum* é considerado negativo ao contrário do *C. xerosis* (14). Entretanto, em trabalho mais recente, Riley & col. (13) definem *C. striatum* como nitrato positivo, como a amostra-padrão por nós utilizada (Tabela 1).

Ainda relacionado a estas duas espécies encontramos o *C. renale*. Os difteroides da Tabela 2 que poderiam estar relacionados com *C. striatum* e *C. renale* aproximam-se do primeiro porque a amostra-padrão produziu fluorescência alaranjada na nossa experiência, embora este resultado se afaste dos de Somerville (19), e ainda porque a espécie *C. renale* parece não fazer parte da microbiota normal humana (8).

Resta ainda relacionar a espécie de posição taxonômica discutida, *C. enzymicum* (14). Entretanto, não foi encontrado na literatura disponível dados sobre sua fluorescência sob luz ultravioleta. Em conclusão, aquelas amostras que não hidrolizaram uréia, não fermentaram maltose e têm comportamento variável em relação ao nitrato poderiam ser relacionadas como *C. striatum* principalmente porque a amostra-padrão utilizada (Tabela 1) mostrou fluorescência positiva sob a luz de Wood.

As quatro amostras que hidrolizaram uréia (Tabela 2) podem corresponder a *C. pseudotuberculosis* ou *C. ulcerans* como discutido por Evans (6) ou ainda *C. bovis* como discutido por Smith (17) para as amostras que não fermentam sacarose.

Aquelas que utilizaram glicose e maltose ou apenas glicose, mostraram comportamento variável em relação ao teste de nitrato e foram urease negativas, embora Marples (11) admitisse como *C. xerosis* microrganismos que hidrolizavam uréia podem ser identificadas como *C. xerosis* porque o comportamento desta espécie em relação a carboidratos foi extremamente variável no trabalho de McBride & col. (12) Smith & col. (17).

Para as amostras inertes em relação aos carboidratos pode-se pensar em *C. pseudodiphtheriticum*, *C. hoagii* e *C. equi*. *C. pseudodiphtheriticum* pode ser afastado porque não produz fluorescência (18) é redutor de nitrato e hidroliza a uréia, embora para esta segunda prova resultados negativos tenham sido assinalados anteriormente (20). Na nossa experiência, de quatorze amostras apenas duas reduziram nitrato, o que afasta doze amostras de serem identificadas como *C. equi*, sabidamente nitrato positivo como a amostra-padrão por nós utilizada (Tabela 1). Resta apenas *C. hoagii* que embora no Manual de Bergey (14) seja considerada como metabolizador de glicose e sacarose, não o é para outros autores (12) à semelhança da amostra-padrão utilizada em nossas experiências (Tabela 1). Esta amostra ainda foi redutora de nitrato como encontrado por Smith & col. (17), ao contrário da orientação do Manual de Bergey (14). Não fica entretanto de todo afastada a hipótese de serem identificadas como *C. equi*, uma vez que já se admite para essa espécie comportamento variável frente ao nitrato e a uréia (4). Entretanto as amostras-padrão de *C. equi* e *C. hoagii* não foram fluorescentes nos nossos resultados. As aparentes dificuldades levam a supor que inúmeras são as amostras que não podem ser classificadas e ainda que talvez venham a pertencer por alguns anos ao grupo das bactérias corineformes não classificadas, encontradas nas superfícies cutâneo-mucosa humanas. Resultados que, muito bem, podem documentar estas dificuldades, são os encontrados com as amostras 41, 40 e 37 da Tabela 2 que são catalase negativas. Amostras catalase negativas foram excluídas do esquema de Somerville (18) no trabalho publicado em 1973 (19).

Como alternativa para demonstração da fluorescência do cultivo microbiano, a introdução do meio B de King se justifica porque a produção de ácidos pela flora concomitante das lesões do eritrasma ocasiona forte fluorescência amarela, dependente do indicador, no meio proposto por Sarkany & col. (15) o que perturba a investigação de difteroides fluorescentes. Além disso algumas partidas de soro fetal bovino foram inibidoras do crescimento bacteriano. O meio de King sendo incolor torna fácil a visualização da fluorescência nele desenvolvida.

Referências Bibliográficas

1. Bier, L.C. - Isolamento de *Odontomyces viscosus* e *Rothia dentocariosa* do sulco gengival humano. Santa Maria, U.F.S.M., 1970. (Tese de Doutoramento).
2. Breed, R.S.; Murray, E.G.D. & Smith, N.R. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 7.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1957.
3. Cohen, S.N. & Nicolai, D. - Simple medium for pigment production by the erythrasma diphtheroid. App. Microbiol., 17:479-480, 1969.
4. Coyle, M.B. & Tompkins, L.S. - Corynebacteria. In: - Lennette, E.H. - Manual of clinical microbiology. 3.ed. Washington, p. 131-138, 1980.
5. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 362p., 1972.
6. Evans, N.M. - The classification of aerobic diphtheroids from human skin. Brit. J. Dermatol., 80:81-83, 1968.
7. Formiga, L.C.D.; Assis, T.L & Assis, F.A. - Eritrasma diagnóstico de laboratório. An. Bras. Dermatol., 49:199-204, 1974.
8. Formiga, L.C.D. - Isolamento e caracterização de bastonetes gram-positivos referidos como difteróides. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1974. (Tese de Mestrado).
9. Holt, R.J. - The esterase and lipase activity of aerobic skin bacteria. Brit. J. Dermatol., 85:18-23, 1971.
10. Hugh, R. & Leifson, E. - The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J. Bacteriol., 66:24, 1953.
11. Marples, R.R. - Diphtheroids of normal human skin. Brit. J. Dermatol., 81:47-54, 1969.
12. McBride, M.E.; Montes, L.F. & Knox, J.M. - The characterization of fluorescent skin diphtheroids. Can. J. Microbiol., 16:914-946, 1970.
13. Riley, P.S.; Hollis, D.G.; Utter, G.B.; Weaver, R.E. & Baker, C.N. - Characterization and identification of 95 diphtheroid (Group JK) cultures isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 9:418-424, 1979.
14. Rogosa, M.; Commins, C.S.; Lelliott, R.A. & Keddie, R.M. - Coryneform group of bacteria. In: - Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., ed. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 599-632, 1974.
15. Sarkany, I.; Taplin, D. & Blank, H. - The etiology and treatment of erythrasma. J. Invest. Dermatol., 51:283-288, 1961.
16. Sarkany, I.; Taplin, D. & Blank, H. - Organism causing erythrasma. Lancet, 2:304-305, 1962.
17. Smith, R.F.; Blasi, D. & Dayton, S.L. - Isolation and characterization of Corynebacteria from burned children. App. Microbiol., 26:554-559, 1973.

18. Somerville, D.A. - Erythrasma in normal young adults. *J. Med. Microbiol.*, 3:57-64, 1970.
19. Somerville, D.A. - A taxonomic scheme for aerobic diphtheroids from human skin. *J. Med. Microbiol.*, 6:215-224, 1973.
20. Welsch, M. & Thibant, J. - A study of corynebacteria from human sources, and specially of their sensitivity to antibiotics. *Anton. Leeuwenhoek J. Microbiol.*, 14:193-213, 1948.

ESTUDO SOBRE O AGENTE ETIOLÓGICO DO "ERITRASMA". II - REAÇÕES SOROLÓGICAS COM O GÊNERO CORYNEBACTERIUM

Luiz Carlos Duarte Formiga

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

Teresa Cristina Moura Malburg

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

Carmem Alexandrina Morais Silva
Arnaldo Feitosa Brada de Andrade

Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde

& Ítalo Suassuna

Faculdade de Ciências Médicas UERJ

Resumo

Estudos sorológicos com corinebactérias foram realizados, principalmente com o *Corynebacterium diphtheriae*, sendo encontrados poucos relatos onde foram empregadas amostras das outras espécies do gênero. As relações sorológicas (aglutinação em tubos) entre estas espécies e amostras de difteróides fluorescentes (*C. minutissimum*) revelaram pequena reatividade cruzada entre a nova espécie e as amostras-padrão do gênero *Corynebacterium*.

Summary

Studies on the causative organism of erythrasma. II - Serological relationships within the genus Corynebacterium

Serological studies of corynebacteria had in the past concentrated mainly on *Corynebacterium diphtheriae* whereas other species of corynebacteria had been studied very little if at all. Antigenic relationships between the member of *Corynebacterium* and *C. minutissimum* had not been investigated. With respect to fluorescent diphtheroids (*C. minutissimum*) evidence was produced indicating that a very slight cross reactivity exists between the new species and the reference strains of *Corynebacterium*.

Estudos sobre *C. diphtheriae* (Andrade, A.F.B. Inst. Microbiol. UFRJ, Rio de Janeiro, 1976, Tese de Mestrado) têm demonstrado a presença de antígenos tipo específicos, termolábeis, de natureza proteica, e espécie específicos, polissacarídeos termoestáveis. Andrade, A.F.B. & col. (Ciênc. Cult., 28:470, 1976), num estudo com preparações antigênicas (células íntegras) aquecidas a 100°C durante duas horas, utilizando imune-soros produzidos em coelhos e através de absorções heterólogas, com amostras de diversas espécies do gênero *Corynebacterium*, obtiveram imune-soros monoespecíficos, não obstante, tenha ocorrido ampla reatividade cruzada entre as amostras-tipo das espécies quando empregados imune-soros não absorvidos. A sorologia mostrou-se satisfatória como recurso adicional a bioquímica, assim estudamos as relações sorológicas da nova espécie (*C. minutissimum*) com amostras-padrão do gênero.

Foram testados pelo menos quatro amostras de um dos cinco grupos bioquímicos descritos anteriormente (Formiga, L.C.D. & col., Rev. Microbiol. - a ser publicado). A obtenção da massa de células, preparação dos antígenos e os testes de aglutinação em tubos, para a pesquisa de títulos homólogos e heterólogos, seguiram as recomendações de Andrade, A.F.B., 1976 (Tese). Foram utilizados soros, obtidos por inoculação em coelhos e outros pertencentes ao Departamento de Microbiologia Médica do Inst. Microbiol. UFRJ, que foram previamente titulados. *C. diphtheriae* (1:2560), *C. xerosis* (1:320), *C. striatum* (1:640), *C. bovis* (1:1280) e *C. hoagii* (1:160).

No trabalho de Andrade, A.F.B (Tese) observou-se aglutinação com títulos homólogos variando entre 1:1280-5120, enquanto que os heterólogos sempre se situaram na faixa inferior a 1:160 e raras vezes atingiram 1:320, embora em todas as ocasiões se tenha surpreendido reação cruzada. As reações com suspensões antigênicas somáticas termoestáveis de difteroides fluorescentes demonstraram (Tabela 1) que apenas a amostra *C. minutissimum* (NCTC 10288) mostrou reatividade cruzada com 4 dos 5 imune-soros, e com títulos muito baixos (1:20). Das 25 amostras testadas apenas 6 reagiram com os imune-soros empregados. Nem todas foram testadas com os imune-soros. Seria desnecessário testar amostras dos grupos 3, 4 e 5 com o imune-soro *C. diphtheriae* por apresentarem padrão bioquímico diverso da espécie. Era de esperar-se número maior de reações cruzadas, o que não

Tabela 1 - Reações de aglutinação de amostras de difteroides fluorescentes com imune-soros de corinebactérias

Grupo amostra	Imune-soro*				
	<i>C. diphtheriae</i> (ATCC 3985)	<i>C. striatum</i> (ATCC 6940)	<i>C. xerosis</i> (ATCC 373)	<i>C. bovis</i> (ATCC 7715)	<i>C. hoagii</i> (ATCC 7005)
	1:2560	1:640	1:320	1:1280	1:160
G1 - <i>C. minutissimum</i>	20	20	20	40	-
G1 - 139	-	-	40	NR	NR
G1 - 68	-	-	-	NR	NR
G1 - 108	-	-	80	NR	NR
G1 - 20, 108	-	-	-	NR	NR
G2 - 03	40	-	160	NR	NR
G2 - 66	160	-	-	NR	NR
G2 - 64, 78, 81	-	-	-	NR	NR
G3 - 02, 140, 154, V3	NR	-	-	-	-
G4 - 10, 112, 117, 147, 155	NR	-	-	-	-
G5 - 83	NR	NR	NR	40	-
G5 - P2, 13, 83, 118, 129, 136	NR	NR	NR	-	-

* Recíproca da diluição em que se observou aglutinação; NR - Reações não realizadas.

aconteceu, mesmo quando foram utilizados imune-soros com títulos altos. Em quatro oportunidades o imune-soro de *C. xerosis* mostrou-se reativo apresentando título bem próximo ao homólogo com a amostra G2-03. Por outro lado, os imune soros do *C. striatum* e *C. bovis* reagiram apenas uma vez e com títulos muito menores. Observa-se na maioria das ocasiões ausência de reatividade cruzada com as espécies do gênero. As amostras dos grupos G3 e G4 não reagiram com nenhum dos imune-soros empregados, embora tenham sido aquelas que mais foram testadas. Os resultados demonstram que os difteróides fluorescentes são um grupo antigenicamente distinto das espécies testadas do gênero *Corynebacterium*, e sugere que a técnica sorológica seja utilizada como complemento da identificação bioquímica.

TRANSMISSION OF BOVINE LEUKEMIA VIRUS THROUGH MILK INGESTION

Carlos H. Romero
Geraldo B. Cruz
Cheryl A. Rowe

Unidade de Pesquisa de Patologia Animal
EMBRAPA
Estrada Rio-São Paulo, Km. 47
23460 Seropédica RJ, Brasil

& Eline M.R. Carvalho

Estação Experimental de Itaguaí
Pesagro-Rio
Estrada Rio-São Paulo, Km. 47
23460 Seropédica RJ, Brasil

Summary

The immunodiffusion test for antibody against the major glycoprotein (gp51) of bovine leukemia virus (BLV) was utilized to monitor the development of BLV infection in calves fed from pools of milk obtained from non-infected and BLV-infected cows. Calves received colostrum from their dams during the first five days of life and thereafter, three liters of milk daily for periods that varied between 11 and 49 days. All calves were bled monthly until they were eight months of age and their serum tested for the presence of antibody to gp51, as evidence of acquired infection with BLV. BLV was successfully transmitted to one (25.0%) out of four calves devoid of maternal antibody and to one (12.5%) out of eight calves with maternal antibody to BLV, after ingestion of milk obtained from cows infected with BLV. Three calves without maternal antibody and 10 with maternally-derived antibody did not acquire BLV infection after ingestion of milk obtained from BLV-free cows for similar periods. It is concluded that BLV is eliminated in the milk of BLV-infected cows and that it can be a source of infection after ingestion by newborn calves.

Resumo

Transmissão do vírus da leucemia bovina através da ingestão de leite

Foi utilizada a prova de imundifusão para detectar a presença de anticorpos contra a glicoproteína maior (gp51) do vírus da leucemia bovina (VLB), para avaliar o desenvolvimento da infecção em bezerros alimentados com leite de vacas livres e infectadas com o vírus da leucemia. Os bezerros recém-nascidos receberam o colostro das mães durante cinco dias e depois três litros de leite, diariamente, por

periodos que variaram entre 11 e 49 dias. Todos os animais em experimentação foram sangrados mensalmente até os oito meses de idade, para acompanhar o aparecimento dos anticorpos como evidência da infecção. O VLB foi transmitido a um dos quatro bezerros (25,0%) sem anticorpos maternos, e a um dos oito (12,5%) portadores de anticorpos maternos, depois da ingestão de leite de vacas infectadas. Como testemunhos foram utilizados três bezerros sem anticorpos maternos e 10 com anticorpos maternos que não adquiriram a infecção pelo VLB, após a ingestão de leite de vacas não-infectadas, por períodos similares. Conclui-se que o VLB é eliminado no leite de vacas infectadas e se constitui numa fonte de infecção para bezerros recém-nascidos.

Introduction

Bovine leukemia virus (BLV) is an oncogenic RNA tumor virus generally accepted to be etiological agent of the adult form of lymphosarcoma (11). BLV is ubiquitous in nature, is usually associated with cattle of European origin and seems to be exogenous to the bovine species (10). In Brazil, although the tumoral form of the disease has been recognized for years (5, 9), it was only recently that sero-epidemiological surveys demonstrated that BLV is actively present in our dairy herds (1, 19). Whereas intra-uterine transmission is known to occur (17), cattle mainly acquire the infection through horizontal transmission (8). However, the nature of this transmission has not been defined. Contact transmission from infected to uninfected animals is relatively efficient, but BLV infectivity has not been demonstrated in natural secretions and excretions such as saliva and urine, respectively (14). Insect (3) and other arthropod (Romero & col. Unpublished data) vectors are suspected of mechanically transmitting BLV. Iatrogenic transmission occurs as a consequence of the inoculation of fresh blood obtained from infected animals, as in blood transfusions. Immunization practices against Anaplasma and Babesia organisms are partly responsible for the high rates of infection encountered (20). In the USA, milk was recently evaluated as a vehicle for introducing BLV infection into calves and was found to be of secondary importance when compared to contact transmission (8). In order to confirm those results in our subtropical environment, we have fed milk from uninfected and BLV-infected cows to young calves that were then reared under extensive management practices.

Material and Methods

Experimental animals - All calves used in the present study were a cross of Holstein Friesian, Guernsey and Brazilian Gir in various degrees of blood and belonged to the Estação Experimental de Itaguaí, Pesagro-Rio. Calves were reared in individual boxes during the first two months of life and then in an open field, as is usually practiced in the tropics.

Reference antigen - The reference antigen was prepared by concentrating the supernatant fluids of a cell line persistently infected with BLV, as previously described (7). The antigen contained both the major envelope glycoprotein gp51 (16) and the structural polypeptide p25 (12).

Reference antiserum - Antiserum specific for BLV, containing antibodies to both gp51 and p25 was obtained from a cow that died of lymphosarcoma (19).

Testing for BLV antibodies - The development of antibodies to BLV was monitored by testing all sera in the agar gel immunodiffusion test for BLV (13). Test conditions were detailed in a previous publication (18).

Experimental design - All calves were fed colostrum from their dams during the first five days of life, at which time both calves and dams were bled for serum to determine the presence of antibodies to BLV. From there onwards, calves received three liters of pooled milk daily for periods that varied between 11 and 49 days. Three calves born to antibody-negative dams, along with 10 calves born to antibody-positive dams were fed milk obtained from antibody-negative cows. Four calves born to antibody-negative dams and eight calves born to antibody-positive cows. All calves were bled monthly for serum, from the second through eighth month of age to be tested in the immunodiffusion test for the presence of antibodies to gp51 and p25, as evidence of acquired infection with BLV.

Results

The seven calves born to antibody-negative dams did not have antibody to BLV antigens in their sera after colostrum intake. Three of these calves fed from a pool of milk from antibody-negative cows did not develop antibodies to BLV. The remaining four calves were fed milk from antibody-positive cows. One of these calves developed antibody two months after being fed during 17 days from the pool of milk obtained from antibody-positive cows. This antibody persisted throughout the eight-month experimental period (Table 1).

The 18 calves born to antibody-positive dams were also allotted to two groups. Seven of the ten calves in the first group had antibody to gp51 in their sera after ingesting colostrum; two remained positive through the second month of testing. These animals were fed from a pool of milk obtained from antibody-negative cows, were all free of antibody by the third month and remained antibody-negative for the eight months. In the other group, five of eight calves had antibody to gp51 in their sera after the ingestion of colostrum. The calves in this group were fed from a pool of milk obtained from antibody-positive cows. After two months, only one calf remained antibody-positive and in addition had developed a second antibody against p25, which disappeared by the third month leaving only antibody against gp51. This antibody persisted for the duration of the experiment (Table 1).

Discussion

It had previously been shown that milk from cows from a herd with a high incidence of lymphosarcoma contained type-C viral particles that were then suspected of being the cause of the adult form of lymphosarcoma (6). These preliminary findings were confirmed with the demonstration of type-C viral particles in buffy coat cultures from cattle with lymphosarcoma (11). Subsequent experiments involving the inoculation of colostrum or milk obtained from

Table 1 - Transmission of BLV to calves* fed milk from non-infected and BLV-infected cows

Dams	Milk donors	Months after beginning of intake of milk								% infected
		0	2	3	4	5	6	7	8	
-	-	0/3**	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0.0
-	+	0/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	1/4	25.0
+	-	7/10	2/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0.0
+	+	5/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	1/8	12.5

*Newborn calves fed colostrum from their dams for five days and then fed three liters of milk from non-infected (-) or BLV-infected (+) cows daily for periods that varied between 11 and 49 days; **Number of calves with antibody to gp51 of BLV/Number of calves tested.

BLV-infected cattle into either sheep (14) or calves (20) showed that both materials are endowed with BLV-infectivity. However, it remained to be demonstrated whether the ingestion of BLV-containing milk could also establish BLV infection, since it is well known that the absorption of macromolecules in calves is limited to the first two or three days of life (4). It had been reasoned that after that time, BLV-infected leukocytes contained in the milk might not be able to pass across the intestinal wall (17). The results of our preliminary trial indicated that calves with and without maternally-derived antibodies can be infected with BLV through ingestion of milk obtained from BLV-infected cows. In this study, pools of milk obtained from non-infected and BLV-infected cows were fed to calves for periods of up to 49 days, in order to ascertain whether milk ingestion could be responsible for the acquisition of BLV infection. One infected calf with maternally-derived antibodies had been fed infected milk for 18 days, while the infected calf without maternal antibodies had received the same milk for 17 days. In the former calf, intra-uterine infection cannot be discarded since the calf was antibody-positive at all times tested and no precolostrum sample was available. However, the serum obtained at two months of age had antibodies against both p25 and pg51, indicating a very recent infection. In the case of the calf without maternal antibodies, it is clear that infection took place after birth and colostrum ingestion. It is interesting to notice that not all calves that were fed milk from BLV-infected cows became infected. These results point toward the poor efficiency of BLV-infected milk in establishing the infection when fed to growing calves, regardless of the presence or absence of maternal antibodies. Yet, the establishment of BLV infection in one (12.5%) out of eight calves with maternal antibodies versus one (25.0%) out of four calves from antibody-negative dams suggests a slight protection of colostrum-derived specific antibodies. None of the calves with or without maternally-derived antibodies became infected with BLV during the eight month experimental period after ingestion of milk obtained from cows free of BLV infection. This finding also indicates that during the course and duration of the present trial, there was no detectable horizontal transmission of BLV and that result obtained were due to the treatments.

Although more extensive trials are required in order to critically evaluate the real importance of infected milk in the transmission of BLV, calves should not be fed with fresh milk derived from cows possessing antibodies to BLV antigens. When antibody-negative milk donors are not available, milk should be heated for at least 30 minutes at 56°C, boiled or pasteurized in order to destroy its infectivity (2). Since there is no doubt that BLV is shed in the milk of infected cows (14, 20), the potential hazard for humans has been raised (21). However, attempts to correlate the occurrence of human leukemia with lymphosarcoma in cattle have so far been negative (15).

Acknowledgments

Part of this study was supported by a grant (222.1690/77) awarded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

References

1. Alencar Filho, R.A.; Mazanti, M.T.; Saad, A.D. & Pohl, R. - Levantamento preliminar da infecção pelo vírus da leucemia linfática crônica (L.L.C.) dos bovinos no Estado de São Paulo. Biológico (S.Paulo), 45:47-54, 1979.
2. Baumgartener, L.E.; Olson, C.; Miller, J.M. & Van Der Maaten, M.J. - Effect of pasteurization and heat treatment on bovine leukemia virus. J. Am. Vet. Med. Ass., 169:1189-1191, 1976.

3. Bech-Nielsen, S.; Piper, C.E. & Ferrer, J.F. - Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: role of blood sucking insects. *Am. J. Vet. Res.*, 39:1089-1092, 1978.
4. Brambell, F.W. - The transmission of passive immunity from mother to young. In: - *Frontier of biology series*. New York, Elsevier/North-Holland, 1970.
5. Dacorso Filho, P.; Langenegger, J.; Faria, J.F. & Aguiar, A.A. - Casos de leucose bovina no Estado do Rio de Janeiro. *Veterinária (Brasil)*, 19:44-54, 1966.
6. Dutcher, R.M.; Larkin, E.P. & Marshak, R.R. - Virus-like particles in cow's milk from a herd with a high incidence of lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 33:1055-1064, 1964.
7. Ferreira, M.I.; Romero, C.H. & Rowe, C.A. - Estudo comparativo entre as provas de imunodifusão em placa e em lâmina na detecção de anticorpos contra o vírus da leucose enzoótica bovina. *Pesq. Vet. Bras.*, 2:49-53, 1982.
8. Ferrer, J.F. & Piper, C.E. - An evaluation of the role of milk in the natural transmission of BLV. *Ann. Rech. Vét.*, 9:803-807, 1978.
9. Freire, M.H.R. & Freitas, V.M. - Constatation de la leucose bovine dans l'État de Rio de Janeiro, Brésil. *Bull. Off. Int. Épis.*, 66:775-782, 1966.
10. Kettmann, R.; Portetelle, D.; Mamerickx, M.; Cleuter, Y.; Dekegel, D.; Galoux, M.; Ghysdael, J.; Burny, A. & Chantrenne, H. - Bovine leukemia virus: an exogenous RNA oncogenic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)*, 73:1014-1018, 1976.
11. Miller, J.M.; Miller, L.D.; Olson, C. & Gillete, K.G. - Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 43:1297-1305, 1969.
12. Miller, J.M. & Olson, C. - Precipitating antibody to an internal antigen of the C-type virus associated with bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 49:1459-1462, 1972.
13. Miller, J.M. & Van Der Maaten, M.J. - Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for bovine leukemia virus antibodies. *Europ. J. Cancer*, 13:1369-1379, 1977.
14. Miller, J.M. & Van Der Maaten, M.J. - Infectivity tests of secretions and excretions from cattle infected with bovine leukemia virus. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62:425-428, 1979.
15. Olson, C. & Driscoll, D.M. - Bovine leukosis: investigation of risk for man. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 173:1470-1472, 1978.
16. Onuma, M.; Olson, C.; Baumgartner, L.E. & Pearson, L.D. - An ether-sensitive antigen associated with bovine leukemia virus infection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55:1155-1158, 1975.
17. Piper, C.E.; Ferrer, J.F.; Abt, D.A. & Marshak, R.R. - Post-natal and prenatal transmission of the bovine leukemia virus under natural conditions. *J. Natl. Cancer Inst.*, 62:165-168, 1979.
18. Romero, C.H.; Aguiar, A.A.; Zanocchi, H.G.; Abaracon, D.; Rowe, C.A. & Silva, A.G. - Susceptibility of the water buffalo (*Babalus bubalis*) to enzootic bovine leukosis virus. *Pesq. Vet. Bras.*, 1:137-140, 1981.

19. Romero, C.H. & Rowe, C.A. - Enzootic bovine leukosis virus in Brazil. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 13:107-111, 1981.
20. Romero, C.H.; Zanocchi, H.G.; Aguiar, A.A.; Abaracon, D.; Silva, A.G. & Rowe, C.A. - Experimental transmission of enzootic bovine leukosis virus with blood and milk in the tropics. *Pesq. Vet. Bras.*, 2:9-15, 1982.
21. Van der Maaten, M.J. & Miller, J.M. - Current assessment of human health hazards associated with bovine leukemia virus. In: - Origins of human cancer. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, p. 1223-1234, 1977.

POLIOMIELITE NO RIO GRANDE DO SUL E PARANÁ: ISOLAMENTO DE POLIOVÍRUS NOS ANOS DE 1979 E 1980

Anita Ivoni Camilotti Monteiro

Laboratório de Virologia
Instituto de Pesquisas Biológicas SSMA
Rua Domingos Crescêncio, 132
90000 Porto Alegre RS, Brasil

Resumo

Usando-se as linhagens de células LLC MK2 e Vero, foram analisados 367 espécimes clínicos, provenientes de pacientes clinicamente suspeitos de poliomielite, dos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná, no período de 1979 a 1980. Na identificação dos vírus isolados, usou-se a técnica de neutralização de efeito citopatogênico, em linhagens de células LLC MK2 e Vero. Em relação ao isolamento, 216 espécimes foram positivos para poliovírus mostrando predominância do poliovírus tipo I em ambos os Estados, com baixa incidência dos poliovírus III e II. Quanto à distribuição mensal, houve predominância nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro no Estado do Paraná, enquanto que no Estado do Rio Grande do Sul tal predominância não pode ser observada. Em termos do grupo etário, o maior número de casos ocorreu em crianças menores de cinco anos, não vacinadas ou com esquema de vacinação incompleto.

Summary

Poliomyelitis in Rio Grande do Sul and Paraná States: virus isolation in 1979 and 1980

Three hundred sixty seven clinic specimens, from patients that were clinically suspected of poliomyelitis, in the States of Rio Grande do Sul and Paraná, were studied within the period from 1979 to 1980. In the laboratory analysis the technique of neutralization of the cytopathogenic effect was used in LLC MK2 and Vero cells lines. In the 216 specimens positive, for poliovirus a predominance of poliovirus type I in both States, with low incidence of poliovirus III and II was evident. Regarding the monthly distribution, there was predominance in the months of December, January and February in the State of Paraná, while in the State of Rio Grande do Sul there was a rather uniform distribution. In terms of age distribution a considerable number of cases occurred in children less than five years of age, not vaccinated or with an incomplete vaccination-schedule.

Introdução

Em vários países, o uso adequado da vacina Sabin tem mostrado a possibilidade de

controle da poliomielite (2, 3, 9, 10, 12). Na busca deste objetivo, é certamente importante o permanente cuidado na imunização de todas as crianças susceptíveis e dos grupos migratórios de diferentes áreas.

Os Enterovírus Polio, Coxsackie e ECHO do grupo Picornavírus (5), mostram variações manifestações clínicas no homem, desde paralisia severa à meningite asséptica, pleurodinia, miocardite, erupções cutâneas até resfriados comuns (5). Entretanto, são muito mais frequentes as infecções sub-clínicas do que os quadros clinicamente manifestos (1, 5).

Os resultados obtidos no presente trabalho, com material proveniente dos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná, no período de 1979 a 1980, mostraram os tipos de vírus circulantes na área, podendo eventualmente tais dados contribuir para uma avaliação de eficiência das medidas de combate à doença.

Material e Métodos

Todos os espécimes clínicos recebidos no laboratório das Unidades de Controle Epidemiológico das Secretarias da Saúde dos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná, constavam de duas amostras de soro, 1ª amostra (período agudo da doença) e 2ª amostra (convalescência da doença), e de uma amostra de fezes, todas elas transportadas em recipiente térmico contendo gelo. Logo após a chegada ao laboratório, os espécimes foram processados de acordo com a técnica recomendada por Schatzmayr & col. (14, 15).

Utilizaram-se as linhagens de células LLC MK2 e Vero, mantidas em meio de Eagle a 10 e 2% de soro de vitelo. Os espécimes clínicos positivos foram identificados através da técnica de neutralização de efeito citopatogênico, segundo Lennette & col. (7), utilizando-se soros imunes padrões específicos, recebidos do Instituto Nacional de Saúde (N.I.H.), Bethesda, Maryland.

Os níveis de anticorpos das amostras pareadas de soros foram determinados, pela técnica de soro-neutralização (8, 16), utilizando-se抗igenos padrões: Polio I Mahoney, Polio II Lansing e Polio III Leon.

Resultados

No Rio Grande do Sul foram, laboratorialmente, confirmados 30 casos de poliomielite, dentre o total de 77 casos (Tabela 1) e no Paraná 186 no total de 290 casos (Tabela 2). Assim, num total de 367 casos suspeitos de poliomielite, nos anos de 1979 e 1980, 216 amostras foram positivas no isolamento.

Os 77 casos suspeitos no Rio Grande do Sul mostraram nítida predominância dos poliovírus tipo I, com 25 amostras positivas (83,3%); apenas uma amostra foi positiva para o tipo II (3,3%) e 4 mostraram ser do tipo III (13%).

Nos 290 casos suspeitos no Paraná, também houve acentuada predominância do poliovírus I, com 175 amostras (94%); 11 foram positivas para o poliovírus III (6%), não se constatando a presença do poliovírus tipo II.

Entre as 222 amostras de enterovírus isolados, 6 não puderam ser identificadas como de poliovírus, tendo sido caracterizadas como vírus Coxsackie do grupo B.

Tabela 1 - Tipos de vírus isolados de casos suspeitos de poliomielite, de acordo com faixa etária, proveniente da Secretaria da Saúde do Estado do Rio Grande do Sul

Idade em anos	Poliovírus					Total
	I	II	III	Negativos	Outros	
0 - 2	16	1	4	20	-	41
2 - 5	6	-	-	8	*1	15
5 - 10	2	-	-	9	-	11
10 - 15	1	-	-	2	-	3
≥ 15	-	-	-	7	-	7
Total	25	1	4	46	1	77

* Coxsackie B1 identificado pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

Os resultados, obtidos pela sorologia em ambos os Estados, coincidem com os isolamentos dos vírus. Os títulos dos soros pareados estão representados pelos resultados obtidos da segunda amostra de soro (Tabela 3, Fig. 4 e 5).

No Rio Grande do Sul verificou-se elevada presença de 90,3% (65 casos) dos soros com anticorpos polio I, enquanto que os soros tipos II e III foram 58,3% e 50% (42 e 36 casos), respectivamente. Inversamente, só 9,7% (7 casos) foram negativos, isto é, não apresentaram anticorpos do tipo I, mas 41,7% e 50% (30 e 36 casos) o foram para os tipos II e III. No Paraná, as cifras foram igualmente expressivas, verificando-se que 5,5% (11 casos) somente dos soros foram negativos, não apresentando anticorpos do tipo I, enquanto que 68,6% e 62,1% (136 e 123 casos) o foram para os tipos II e III.

As diluições 1:80 e 1:160 (Tabela 3, Fig. 4 e 5) concentram a maioria dos casos com anticorpos para polio I, ainda confirmando a predominância deste.

Quanto à conversão sorológica, nos soros dos pacientes do Rio Grande do Sul, 22 soros (30,5%) apresentaram-na para polio I e dois soros (2,7%) para polio III. Igualmente no Paraná houve maior conversão para polio I com 139 soros (70,2%) e para polio III com 11 soros (5,5%). Somente 2 soros (1%) foram polio II.

A distribuição mensal dos casos mostrou (Fig. 1), no Paraná, um aumento gradativo até janeiro de 1980, quando passou a decair. No Rio Grande do Sul não houve variação significativa.

A incidência máxima, tanto no Rio Grande do Sul (Fig. 2) como no Paraná (Fig. 3), verificou-se nas crianças não vacinadas, sendo a maioria de idade inferior a 5 anos.

Discussão

A poliomielite, em nosso meio, ainda é endêmica e frequentemente epidêmica (11). O isolamento de poliovírus no Brasil evidencia uma predominância do tipo I, com um pequeno número de amostras positivas para os demais tipos (4, 6, 14, 15). A predominância do tipo I, tanto pela sorologia como pelo isolamento, além de validar reciprocamente ambos os dados no Rio Grande do Sul e Paraná, estende também a essas unidades, no período de 1979 e 1980, a mesma tendência. A maior incidência de casos nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro observada no Paraná, já foi relatada em

Tabela 2 - Tipos de vírus isolados de casos suspeitos de poliomielite, de acordo com faixa etária, provenientes da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná

Idade em anos	Poliovírus					Total
	I	II	III	Negativos	Outros	
0 - 2	131	-	10	54	*2	197
2 - 5	38	-	-	22	**3	63
5 - 10	4	-	1	10	-	15
10 - 15	2	-	-	8	-	10
≥ 15	-	-	-	5	-	5
Total	175	-	11	99	5	290

* Dois casos de Coxsackie B5 identificados pelo Instituto de Pesquisas Biológicas do Rio Grande do Sul;

**Um caso de Coxsackie B2 e dois de Coxsackie B5 identificados pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro.

Tabela 3 - Distribuição de casos suspeitos de poliomielite, no Estado do Rio Grande do Sul com 72 e Paraná com 198 casos, de acordo com os títulos dos anticorpos neutralizantes dos soros da segunda amostra

Policovírus Título	Rio Grande do Sul			Paraná		
	I	II	III	I	II	III
≤ 5	7	30	36	11	136	123
10	7	9	7	4	8	5
20	12	19	7	11	13	12
40	11	8	11	21	18	13
80	13	3	6	64	8	26
160	18	1	4	61	9	12
≥ 320	4	2	1	26	6	7

outro Estado brasileiro (15). O predomínio de um tipo sorológico de vírus isolado, o aparecimento dos casos em surtos e a frequência em menores de cinco anos, sugerem uma desuniformidade no esquema vacinal (11).

Figura 1 - Distribuição mensal das amostras positivas, dos Estados do Rio Grande do Sul e Paraná no período de julho de 1979 a julho de 1980

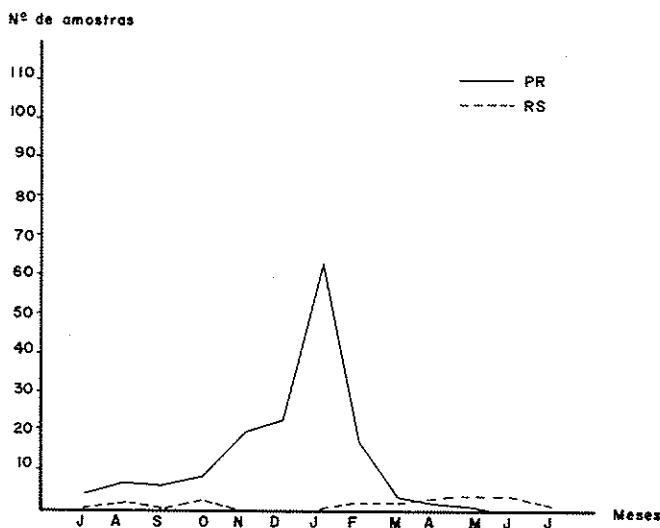
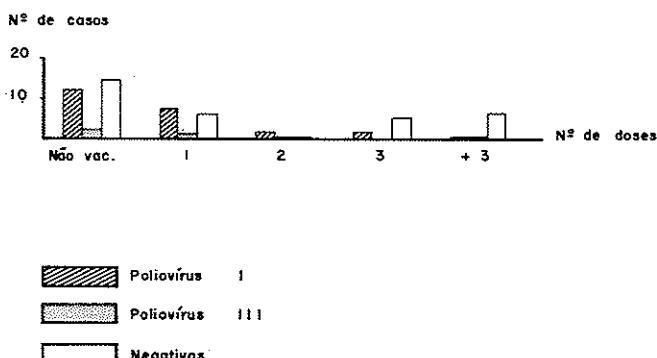


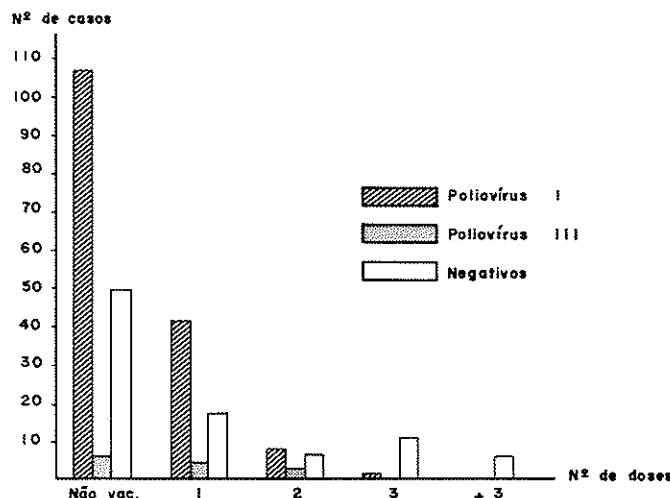
Figura 2 - Tipos de poliovírus isolados, relacionados com as doses de vacina Sabin, nos pacientes do Estado do Rio Grande do Sul



A importância das vacinações pode ser apreciada através da sorologia, pois os soros das crianças não vacinadas, mostraram maior número de inversões sorológicas ao vírus isolado com ausência de anticorpos para os demais tipos, logo alta susceptibilidade (Tabela 3, Fig. 4 e 5) aos polios II e III. Enquanto que, nos soros das crianças que haviam recebido doses insuficientes de vacina, aumentou a fre-

quência de anticorpos para os poliovírus II e III, diminuindo o número de suscetíveis.

Figura 3 - Tipos de poliovírus isolados, relacionados com as doses de vacina Sabin, nos pacientes do Estado do Paraná



À medida que aumenta o número de doses de vacina, diminuem os casos positivos, confirmado-se assim, que a poliomielite é uma doença controlável através de esquemas contínuos e adequados de vacinação, capazes de manter níveis eficazes de imunidade na população (2, 13).

Figura 4 - Representação gráfica dos dados constantes na Tabela 3, referentes ao Rio Grande do Sul

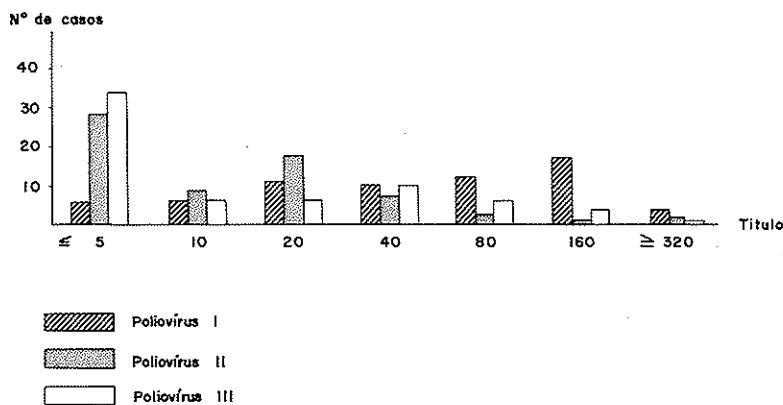
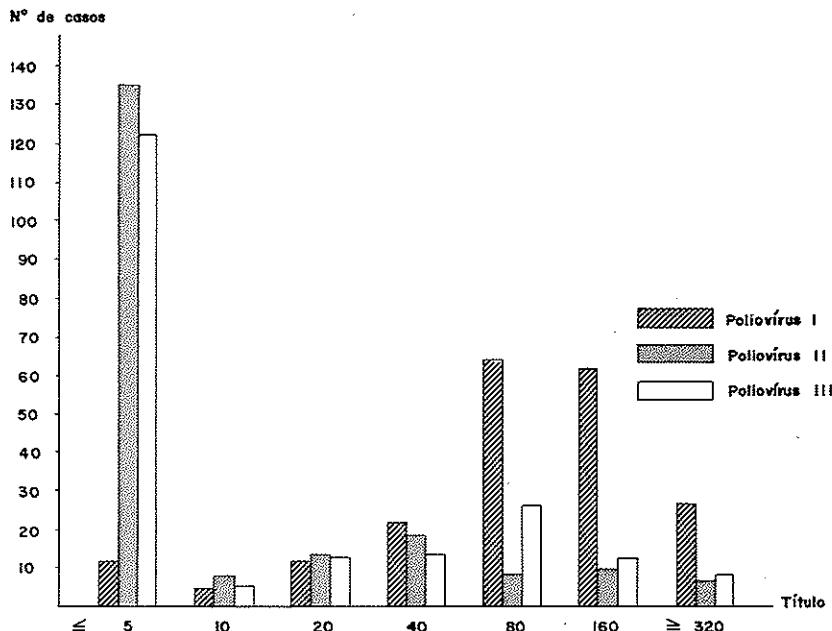


Figura 5 - Representação gráfica dos dados constantes na Tabela 3, referentes ao Paraná



Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Hermann G. Schatzmayr e seus colaboradores, o apoio recebido, bem como à equipe do Laboratório de Virologia do Instituto de Pesquisas Biológicas e a todos os demais que colaboraram na realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Debre, R. & Celers, J. - Clinical virology. Philadelphia, W. B. Saunders, 1970.
2. Forbes, C.A.L.; Fernando, N.I.; Motte, P.U. & Mendis, N.M.P. - A survey to determine the immunity and antibody creating effect of oral polio vaccine. *J. Trop. Med. Hyg.*, 83:109-113, 1980.
3. Giovanardi, A. - Effect of Sabin poliovirus vaccine on incidence of poliomyelitis in Italy. *J.A.M.A.*, 209:525-528, 1969.
4. Hubinger, M.G. Von; Meilman, I.; Guimarães, J.C.; Vasconcelos, C.M.M. & Ono, I.P. de C. - Poliomyelitis in Rio de Janeiro during the period of 1970 to 1974. I - Virological and epidemiological aspects. *An. Microbiol.*, 23:35-50, 1978.
5. Jawetz, E.; Melnick, J.L. & Adelberg, E.A. - Microbiologia médica. 10.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.381, 1974.
6. Lacerda, J.P.G.; Vieira, E.F. de I.; Martin, B.S. & Giusti, L.S. - Isolamento e identificação de poliovírus em São Paulo de 1967 a 1970. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:21-25, 1971.

7. Lennette, E.H.; Spaulding, E.H. & Truant, J.P. - Manual of clinical microbiology. 2.ed. Washington DC., American Society for Microbiology, 1974.
8. Liberto, M.I.M.; Hubinger, M.G. Von; Meilman, I.; Vasconcelos, C.M.M. de & Ono, I.P. de C. - Immunological response for polioviruses in cases of poliomyelitis in Rio de Janeiro, in 1975. Rev. Lat-amer. Microbiol. 20:169-173, 1978.
9. Melnick, J.L.; Burkhardt, M.; Taber, L.H. & Erickson, P.N. - Developing gap in immunity to poliomyelitis in an urban area. J.A.M.A., 209:1181-1185, 1969.
10. Miller, L.W.; McGowan Jr., J.E. & Leffingwell, L.M. - Poliomyelitis in a high risk population: do we need to immunize the new born? Pediatrics, 49:530-535, 1972.
11. Organização Mundial da Saúde - La poliomielite en 1970. Chronique, 25:558-564, 1971.
12. Phillips, C.A.; Aronson, M.D.; Tomkow, J. & Phillips, M.E. - Enteroviruses in Vermont, 1969-1978: an important cause of illness through the year. J. Infec. Dis., 141:162-164, 1980.
13. Sabin, A.B. - Vaccination against poliomyelitis in economically underdeveloped countries. Bull. W.H.O., 58:141-157, 1980.
14. Schatzmayr, H.G. & Sales, H.L. - Investigações sobre infecções por enterovírus no Distrito Federal. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 64:125-130, 1966.
15. Schatzmayr, H.G.; Homma, A.; Meilman, I. & Villas Boas, D.M. - Levantamento epidemiológico e virológico de casos suspeitos de poliomielite, no Hospital Estadual Jesus, no período de janeiro de 1967 a março de 1968. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 2:229-235, 1968.
16. Schatzmayr, H.G.; Homma, A.; Loureiro, M.L.P. & Denne, Y.S. - Avaliação sorológica da vacina oral tipo Sabin, contra a poliomielite em região semi-rural. II - Aspectos quantitativos dos anticorpos formados e anticorpos para outros enterovírus. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 4:225-228, 1970.

ANTIGENIC COMPARISON BETWEEN TRITRICHOMONAS SUIS, T. FOETUS, TRICHOMONAS VAGINALIS AND T. GALLINAE BY GEL IMMUNODIFFUSION*

Geraldo Attilio de Carli

Dept^o de Análises
Faculdade de Farmácia UFRGS
90000 Porto Alegre RS, Brasil

Summary

Twelve rabbits were used for the production of the immune sera against *T. suis*, *T. foetus*, *T. vaginalis* and *T. gallinæ* antigens. Three animals were injected with each species of *Tritrichomonas* and *Trichomonas*. In the reactions between these immune sera and antigens of each of special the largest number of precipitating lines were observed between homologous systems using gel immunodiffusion. Using the Ouchterlony technique the antigens of *T. suis*, *T. foetus*, *T. vaginalis* and *T. gallinæ* showed 1, 2, 3 or 4 lines in the A antigenic group and 1 and 2 precipitating lines in group B. The results obtained with the immune sera of *T. suis*, *T. foetus*, *T. vaginalis* and *T. gallinæ* indicated that the four trichomonads have identical antigens, or at least a closely related antigenic structure.

Resumo

Comparação antigenica entre *Tritrichomonas suis*, *T. foetus*, *Trichomonas vaginalis* e *T. gallinæ* pela imunodifusão em gel

Doze coelhos foram usados para a produção dos imuno-soros contra抗igenos de *Tritrichomonas suis*, *T. foetus*, *Trichomonas vaginalis* e *T. gallinæ*. Três animais foram injetados com cada espécie de *Tritrichomonas* e *Trichomonas*. Nas reações entre estes imuno-soros e os抗igenos de cada uma das espécies, o maior número de linhas de precipitação foi observado, entre os imuno-soros e抗igenos homólogos na difusão em gel. Usando-se a técnica de Ouchterlony, os抗igenos de *T. suis*, *T. foetus*, *T. vaginalis* e *T. gallinæ* mostraram 1, 2, 3, ou 4 linhas no grupo antigenico A e 1 e 2 linhas de precipitação no grupo B. Os resultados obtidos com os imuno-soros de *T. suis*, *T. foetus*, *T. vaginalis* e *T. gallinæ* indicaram que os quatro tricomonas têm抗igenos idênticos, ou pelo menos com estrutura antigenica relacionada muito próxima.

*Supported by a research grant of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil, project Immunol. 204/79.

Introduction

Studies of the antigenic comparison between *Tritrichomonas suis* and *T. foetus* have been performed using the indirect immunofluorescence (4), gel immunodiffusion (5) and immunolectrophoresis techniques (6). The results obtained indicated the existence of antigens that are common to both species or perhaps associated with a generic antigenic identity. In the present investigation the antigenic relation between *T. suis*, *T. foetus*, *T. vaginalis* and *T. gallinae* was studied through gel immunodiffusion with the purpose of obtaining new information on the antigenic affinity of the four species.

Material and Methods

Protozoan species - Tritrichomonas suis - This strain has been described previously (3). Cultures of the protozoa were maintained in axenic cultures in modified Diamond medium (3) at 35,5°C and transferred every 48 hours.

Tritrichomonas foetus - The history of this specie was given in a previous report (4). At first the sample was spread in Feinberg & Whittington medium and transferred every 72 hours (8). After that the axenic culture was maintained in modified Diamond medium at 35,5°C and transferred every 48 hours.

Trichomonas vaginalis - The sample TV 1 was isolated from the vaginal secretion from a woman, patient in a gynecological clinic in Porto Alegre, RS. This strain has been kept in axenic culture in modified Diamond medium since 1973 (2). The cultures were incubated at 35,5°C and transferred every 48 hours.

Trichomonas gallinae - The methods of isolation, cultivation and preservation of the TG 1 isolated by De Carli, Pansera & Guerrero from upper digestive tract of a domestic pigeon were described previously (7). The culture of the parasites were maintained in modified Diamond medium at 35,5°C and transferred every 48 hours.

Preparation of antigens for immunization - Antigens of each species were extracted from each organism as previously described (4). The strains of *T. vaginalis* and *T. gallinae* which had the same treatment during the preparation of the antigens, were included. All disrupted antigens were stored at -20°C.

Concentration of total nitrogen and protein of the antigens - The concentration of total nitrogen was determined by technique of Kjeldhal modified by Taveira & Bethelém (21) and total protein was determined by the method of Foling-Ciccoalteau as described by Lowry (16). The results of these analyses are given in Table 1.

Immunization of rabbits and immune sera - Twelve rabbits were used for the production of the immune sera against each of the four species. The method of preparation was as previously described (4). The immune sera and the rabbit normal sera (NRS), prepared for the indirect immunofluorescence study (4) were used in the present investigation.

Gel immunodiffusion technique - The technique of immunodiffusion described by Outcherlonny (18) was used for the identification of *Tritrichomonas* and *Trichomonas* antigens. Glass slides (75 x 50mm) were used for this technique. The gel layer was prepared by addition of 5ml of liquid purified agar (BBL) at 1% over the glass slides. Sodium azide

Table 1 - Protein and total nitrogen of the antigens used in the gel diffusion precipitin reactions

Antigens		Protein mg/ml	Total N mg/ml
<i>T. suis</i>	TS	1,8	0,37
<i>T. foetus</i>	TF	16,0	2,61
<i>T. vaginalis</i>	TV	5,0	0,8
<i>T. gallinae</i>	TG	6,0	0,96

(Difco) was used as a preservative of the gel in a final concentration of 0.1%. A seven wells pattern cutter used being the internal diameter of the wells of 5mm with a distance of 5mm between them, or five wells pattern cutter was used being the internal diameter of the wall of 5mm with distance of 10mm between them. The external wells of the perforated gel were used for the immune sera and the internal well was used for the antigens. For all reactions, the wells were loaded with 20 μ l of antigens and 50 μ l of undiluted antiserum. The antigen antibody reactions were processed in humid chamber at room temperature (22°C). The readings were made 48 hours after the beginning of the diffusion. Oblique lighting against a dark field was used for reading the reactions. The precipitating lines were stained by Ponceau fixing stain. All of the reactions were photographed as previously described (22). All of the reactions were photographed 48 hours after the incubation using the technique described by Williams & Chase (22).

Results and Discussion

Negative results were found in the reactions that involved normal rabbit serum (NRS) and four protozoan antigens studied. No precipitating lines were formed when the four antisera reacted with the sterile culture medium, sterile components of these media, horse sterile components of these media, horse sterile and inactivated horse serum diluted and not diluted. No precipitin lines were formed in the slides containing sterile distilled water, sterile physiological saline solution. Negative reactions among baseline bleeding serum and *Tritrichomonas* and *Trichomonas* antigens proved that the rabbits utilized in this study had not a previous contact with these antigens. In each series of experiments the specific immune serum reacted against the homologous and heterologous antigens. The immune reactions between the immune sera of both systems were represented by two groups of precipitation lines or bands.

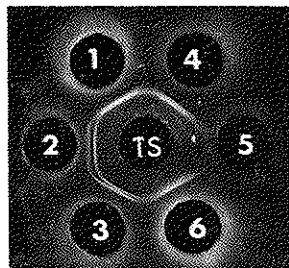
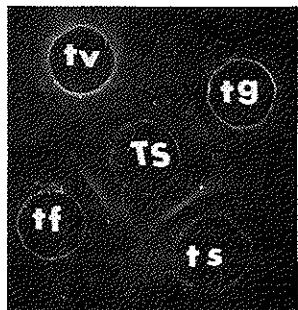
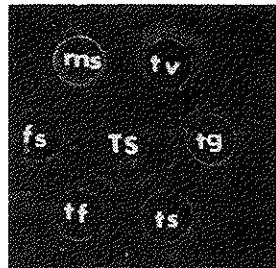
According to Goldman & Honigberg (11) these group were arbitrarily designated group A and group B based on their position. Group A of precipitation lines always developed closer to the serum wells, and were concave to their side. Group B lines, were located closer to the antigen wells and concave to its side. The precipitation lines obtained in the heterologous systems were classified according to Wilson & Pringle (23); Outcherlony (18) and Crowle (9, 10). The tests performed with each antiserum show reactions comparing the immune sera and NRS with the heterologous and homologous antigens as follows; one-well reactions with the homologous antigens and three-well reactions with the heterologous antigens.

Anti-Tritrichomonas suis serum - When *T. suis* (TS) antigen reacted against its homologous antiserum it showed the strongest reaction. A great number of lines from groups A and B were formed in the reaction among TS antigen and their homologous antiserum. No reactions occurred between TS antigen and *T. vaginalis* antiserum (tv) (Fig. 1 and 2). When the antigen TS reacted against homologous and heterologous sera it showed two, three and four lines in group A and one and two lines in group B (Fig. 1, 2 and 3). When the TS antigen reacted against *T. foetus* (tf) and *T. gallinae* (tg) immune sera showed lines with total identity (Fig. 1 and 3). Most of these lines from both homologous and heterologous systems showed total identity (Fig. 1 and 3) and partial identity (Fig. 6). No conclusion can be described about any lines of group B antigenic systems. The results of these experiments with anti-*T. suis* serum indicated that both *T. foetus* and *T. gallinae* have antigen which are identical or at least very closely structurally related or identical antigen in the A and B group.

Anti-Tritrichomonas foetus serum - This serum gave the largest number of lines with its homologous antigen. When the *T. foetus* (TF) antigen reacted against the homologous and heterologous antisera one to three lines in group A and two lines in group B were formed (Fig. 5 and 7). When TF antigen reacted against the immune sera of *T. suis* (ts) and *T. gallinae* (tg) only lines with partial identity were developed (Fig. 4 and 6). Most of these lines from both homologous and heterologous

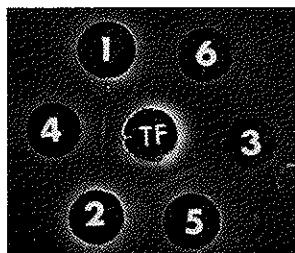
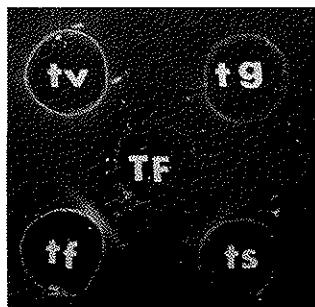
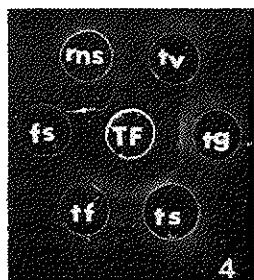
system showed total identity (Fig. 4) and partial identity (Fig. 6). No reaction occurred between TF antigen and *T. vaginalis* (tv) antiserum (Fig. 5). It is evident from the results that either *T. foetus*, *T. suis* and *T. gallinae* have identical antigens, or are very closely related in the group A. The *T. foetus* apparently appear to share one of the group B antigen of *T. gallinae* (Fig. 5).

Figures 1, 2, 3 - Precipitation lines of reaction between *T. suis* antigen (TS) and anti-*T. vaginalis* antisera (tv), anti-*T. gallinae* antisera (tg), anti-*T. foetus* antisera (tf and wells 4, 5 and 6) and anti-*T. suis* antisera (ts wells 1, 2 and 3)



Anti-*Trichomonas vaginalis* serum - Reactions between *T. vaginalis* (tv) antiserum and its homologous antigen resulted in the formation of one and two lines on the group A (Fig. 8). When *T. vaginalis* (tv) antigen reacted against *T. gallinae* (tg) antiserum, there was one line with total identity in group A (Fig. 9). No reactions occurred between TV antigen and *T. suis* (ts) and *T. foetus* (tf) antiserum (Fig. 8 and 9). When TV antigen reacted against homologous and heterologous sera, these were one and two lines in A group alone, and not lines in B group. The results indicated a very close antigenic relation of superficial antigens between the two species of *Trichomonas*.

Figures 4, 5, 6 - Precipitation lines of reactions between *T. foetus* antigen (TF) and anti-*T. vaginalis* antisera (tv), anti-*T. gallinae* antisera (tg), anti-*T. foetus* antisera (tf and wells 4, 5 and 6) and anti-*T. suis* antisera (ts wells 1, 2 and 3)



Anti-Trichomonas gallinae serum - The strongest reactions was observed between *T. gallinae* (TG) antigen and its homologous antiserum (Fig. 10). When the TG antigen reacted against homologous and heterologous sera it showed one and two lines in the A group (Fig. 10). The reactions between TG antigen against *T. vaginalis* (tv) serum showed two lines in group A with partial identity (Fig. 11). The precipitin lines observed in reaction involving TG antigen and *T. suis* (ts) and *T. foetus* (tf) immune sera showed one line on the A group with total identity. The results of experiments with *T. gallinae* (TG) antigen against *T. suis* (ts), *T. foetus* (tf) and *T. vaginalis* (tv) antiserum showed evidence that this trichomonads have identical antigens or very closely related antigenic structure.

Conclusions

The results of previous study on indirect immunofluorescence (4), gel immunodiffusion (5) and immunoelectrophoresis (6) suggested the close antigenic relationships between *T. suis* and *T. foetus*. Recent light and electronic observations provided a similar morphology in the two *Tritrichomonas* and two *Trichomonas* species (7, 13, 15, 17, 19). The close antigenic relationships between these two genera could reveal the existence of cross reacting antigens but did not give information concerning the number of common antigens responsible for these reactions (12, 14, 20). They indicated, also that *T. suis*, *T. foetus* and *T. gallinae* were antigenically more closely related to each other. It has been proved through gel immunodiffusion that *T. vaginalis*, *T. gallinae* and *T. foetus* share structurally identical or closely related antigens, confirming the results suggested previously through studies with trichomonads of genera *Tritrichomonas*.

Figures 8, 9 - Precipitation lines of reactions between *T. vaginalis* antigen (TV) and anti-*T. vaginalis* antisera (tv), anti-*T. gallinae* antisera (tg), anti-*T. foetus* antisera (tf), and anti-*T. suis* antisera (ts)

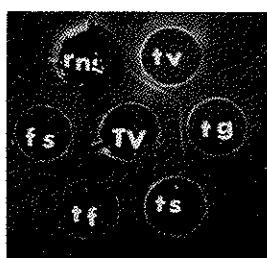
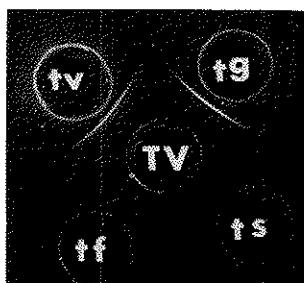


Figure 7 - Precipitation lines of reactions between *T. foetus* antigen (TF) and anti-*T. vaginalis* antisera (tv), anti-*T. gallinae* antisera (tg), anti-*T. foetus* antisera (tf) and wells 4, 5 and 6) and anti-*T. suis* antisera (ts and wells 1, 2 and 3)

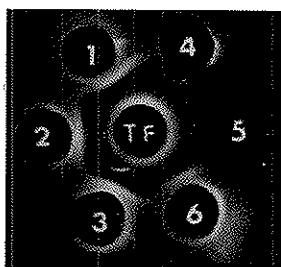


Figure 10 - Precipitation lines of reactions between *T. gallinae* antigen (TG) and anti-*T. vaginalis* antisera (tv), anti-*T. gallinae* antisera (tg), anti-*T. foetus* antisera (tf), and anti-*T. suis* antisera (ts)

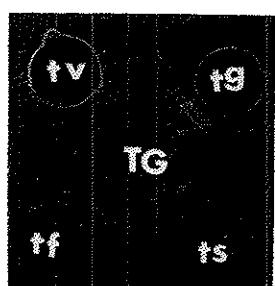
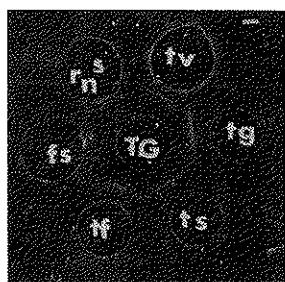


Figure 11 - Precipitation lines of reactions between *T. gallinae* antigen (TG) and anti-*T. vaginalis* antisera (tv), anti-*T. gallinae* antisera (tg), anti-*T. foetus* antisera (tf), and anti-*T. suis* antisera (ts)



Abbreviations

TS - *T. suis* antigen; TF - *T. foetus* antigen; TV - *T. vaginalis* antigen; TG - *T. gallinae* antigen.
ts - *T. suis* antisera; tf - *T. foetus* antisera; tv - *T. vaginalis* antisera; tg - *T. gallinae* antisera.
1,2 and 3 - antisera of *T. suis*; 4, 5 and 6 - antisera of *T. foetus*.

Acknowledgements

The author indebet to Dr. Jorge Gurerro, Manager Pre-clinical Research, Pitman-Moore, Inc., New Jersey, USA, for his kind revision of the manuscript, and thankas are due to Professor Paulo Jaconi Saraiva, Mr. Eni Pereira Nunes and Miss Silvia Guterres.

References

1. Abraham, R. & Honigberg, B.M. - Structure of *Trichomonas gallinae* (Rivolta). *J. Parasitol.*, 5:608-619, 1964.
2. De Carli, G.A. & Machado, B. - Epidemiologia e diagnóstico laboratorial de *Trichomonas vaginalis*. *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 4:33-36, 1973.
3. De Carli, G.A. & Guerrero-Ramirez, J. - *Trichomonas suis*: isolamento, morfologia e incidência na cavidade nasal de porcos domésticos Sus Scrofa. *Rev. Fac. Med. Zootec. Univ. S. Paulo*, 12:269-276, 1975.
4. De Carli, G.A. & Guerrero, J. - Comparação antígenica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus*. I - Imunofluorescência indireta (IFI). *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 6:55-58, 1975.
5. De Carli, G.A. & Guerrero, J. - Antigenic comparison between *Tritrichomonas suis* and *T. foetus*. II - Gel immunodiffusion (ID). *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 18:167-171, 1976.
6. De Carli, G.A. & Guerrero, J. - Comparação antígenica entre *Tritrichomonas suis* e *T. foetus*. III - Imunoelétrforese (IEF). *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 8:107-109, 1977.
7. De Carli, G.A.; Pansera, M.C.G. & Guerrero, J. - *Trichomonas gallinae* (Rivolta, 1878) Stabler, 1938, no trato digestivo de pombos domésticos, *Columba livia*, no Rio Grande do Sul: primeiro registro. *Acta Biol. Leopoldesia*, 1:85-95, 1979.
8. De Carli, G.A. & De Carli, M. - Um meio simples para o cultivo de *Tritrichomonas foetus* in vitro. *Acta Biol. Leopoldesia*, 2:89-90, 1980.
9. Crowle, A.J. - Interpretation of immunodiffusion test. *Ann. Rev. Microbiol.*, 14:161-176, 1960.

10. Crowle, A.J. - Immunodiffusion. 3.ed. New York, Academic Press, 333p., 1961.
11. Goldmann, M. & Honigberg, B.M. - Immunologic analysis by gel diffusion techniques of effects of prolonged cultivation on *Trichomonas gallinae*. J. Protozool., 15:350-352, 1968.
12. Honigberg, H.F.; Friedman, H. & Stepkowski, S. - Effect of different immunization procedures on agglutination and precipitation reactions of *Trichomonas gallinae*. J. Parasitol., 57:363-369, 1971.
13. Honigberg, B.M. & King, V.M. - Structure of *Trichomonas vaginalis* Donné. J. Parasitol., 50:345-364, 1964.
14. Honigberg, B.M. & Goldman, M. - Immunologic analysis by quantitative fluorescent antibody methods of the effects of prolonged cultivation on *Trichomonas gallinae*. J. Protozool., 15:176-184, 1968.
15. Kirby, H. - The structure of the common intestinal trichomonad of man. J. Parasitol., 31:163-175, 1945.
16. Lowry, O.H. - Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193:265-275, 1951.
17. Nielsen, M.H. - The ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* Donné before and after transfer from vaginal secretion to Diamonds medium. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 83:581-589, 1975.
18. Outcherlony, O. - Immunodiffusion and immunelectrophoresis. In: - Weir, M. - Handbook of experimental immunology. Oxford, Blackwell, cap. 19, p. 655-706, 1967.
19. Smith, B.F. & Stewart, B.T. - Fine structure of *Trichomonas vaginalis*. Exp. Parasitol., 19:52-63, 1966.
20. Stepkowski, S. & Honigberg, B.M. - Antigenic analysis of virulent and avirulent strains of *Trichomonas gallinae* by gel diffusion methods. J. Protozool., 19:306-315, 1972.
21. Taveira, M. & Bethlem, M.L. - Doseamento de proteínas. In: - Química bromatológica: métodos de análises de alimentos. Rio de Janeiro, Fac. de Farmácia, Univ. Fed. do Brasil, fasc. 1, p. 75-80, 1975.
22. Williams, C.A. & Chase, M.W. - Photography of precipitates in gels. In: - Methods immunology and immunochemistry. New York, Academic Press, v. 3 cap. 14, p. 321-339, 1971.
23. Wilson, M.W. & Pringle, B.H. - Interpretation of Outcherlony precipitin test. J. Immunol., 75:460-469, 1955.

ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÊNICAS E ROTAVÍRUS DETECTADOS EM CRIANÇAS COM GASTROENTERITE AGUDA EM BELÉM, PARÁ*

Edvaldo Carlos Brito Loureiro

Instituto Evandro Chagas FSESP
Caixa Postal 621
66000 Belém PA, Brasil

Marlene Braide Serafim

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

Alexandre da Costa Linhares

Instituto Evandro Chagas FSESP

& Antonio Fernando Pestana de Castro

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia UNICAMP

Resumo

Procurou-se pesquisar, em Belém do Pará, a presença de *Escherichia coli* enterotoxigênica e outros enteropatógenos, incluindo agentes virais, nas fezes de 44 crianças de 0 a 5 anos de idade, com quadro diarréico agudo. A presença de bactérias enteropatogênicas foi investigada pela coprocultura e a pesquisa de rotavírus através das técnicas de ELISA e contra-imunoelétricosmoforese. O isolamento de enterovírus foi feito em cultura de células (Vero e HEp 2) e camundongo recém-nascido. Helmíntos e protozoários intestinais foram procurados pelo método direto. Trinta e três (75%) dos casos foram positivos para um ou mais enteropatógenos, sendo 30,3% de etiologia bacteriana, 39,4% de origem viral e 30,3% de infecção mista. A procura de enterotoxina LT e ST em 153 cepas de *E. coli* isoladas dos pacientes, foi feita, pelos testes de imuno-hemólise passiva (PIH) e camundongo recém-nascido (Teste de Dean), respectivamente. Cepas enterotoxigênicas de *E. coli*, em número de 17 foram isoladas de sete dos 44 pacientes estudados. Em nenhuma amostra ocorreu produção simultânea de duas enterotoxinas.

Summary

Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from children with acute gastroenteritis, Belém, Pará

Fourty-four children, up to 5 years of age, with acute

*Trabalho realizado com auxílio parcial do CNPq e FINEP.

diarrhea were examined for the presence of enterotoxigenic *E. coli* and other enteropathogens including viral agents. Stool cultures were performed for bacterial isolations; detection of rotavirus antigen was made by ELISA and counter-immunoelectroosmophoresis. Specimens were also inoculated into Vero, HEp 2 cell lines, as well as in baby mice for the isolation of enteroviruses. Helminths and protozoans were searched by direct examination. Thirty-three (75%) specimens were positive for one or more than one enteropathogen; 30,3% were bacterial isolates, 39,4% were of viral etiology and 30,3% were mixed infections. LT and ST enterotoxin were assayed in 153 strains of *E. coli* through Passive Immune Hemolysis and the Dean test in baby mice, respectively. Seventeen strains of enterotoxigenic *E. coli* were isolated from 7 out of 44 children suffering from diarrhea. No strain produced both enterotoxins simultaneously.

Introdução

As diarréias têm sido relatadas como importantes causas de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento (15). Até recentemente, entretanto, a etiologia dessas síndromes era determinada aproximadamente, em apenas 20% dos casos (23).

Nos últimos 10 anos, intensas investigações levaram a identificação de 3 grupos bem definidos de colibacilos enteropatogênicos encontrados em casos de diarréia aguda. A *Escherichia coli* enteropatogênica clássica tem sido responsável por frequentes surtos de diarréia infantil, sendo a sua identificação realizada através de provas de soro-aglutinação com antícorpos específicos, desconhecendo-se, até o presente, quais os possíveis mecanismos de enteropatogenicidade envolvidos na etiopatogénia das diarréias causadas por estes microrganismos (21). Atualmente, se tem dado grande importância aos colibacilos enterotoxigênicos como causa de diarréia, não só no homem como nos animais. Estas bactérias produzem, simultaneamente ou em separado, pelo menos dois tipos de enterotoxinas ditas termolábil (LT) e termoestável (ST), tendo sido relatadas em São Paulo (8, 16, 18), Florianópolis (10), Manaus (9) e mais recentemente em Recife (13). Finalmente, existe o grupo de colibacilos invasores os quais atuam por mecanismo semelhante ao de *Shigella*.

O presente trabalho teve como finalidade principal estudar, em Belém do Pará, o papel desempenhado por *E. coli* enterotoxigênica e os rotavírus como causa de diarréia em crianças de até 5 anos de idade, procurando-se deste modo a obtenção de dados que aumentem o número de casos de diarréia identificadas quanto à sua natureza etiológica.

Material e Métodos

Foram examinadas 44 crianças portadoras de quadro diarréico agudo, na faixa etária de 0 a 5 anos, atendidas em clínicas particulares de Belém e no Hospital da Santa Casa de Misericórdia do Pará.

A coleta de espécimes fecais foi anterior à administração de qualquer antibiótico ou quimioterápico. Os espécimes foram enviados em frascos apropriados, para o Instituto Evandro Chagas, onde foram realizados os exames bacteriológico, parasitológico e virológico. Em um tempo nunca superior a 2 horas após a coleta, os espécimes foram processados na seção de bacteriologia, de acordo com os métodos propostos por Edwards & Ewing (3). Além da *E. coli* enterotoxigênica, foram ainda pesquisadas as seguintes bactérias enteropatogênicas: *Salmonella*, *Arizona*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* e sorotipos enteropatogênicos clássicos de *E. coli*.

Cento e cincoenta e três cepas de *Escherichia coli* foram isoladas dos 44 casos de diarréia aguda. Após identificação bioquímica e sorológica, foram estocadas em BHI ("Brain Heart Infusion" - Difco) com 15% de glicerol estéril e mantidas a -20°C até

a realização dos testes para verificação da capacidade de produzir as enterotoxinas ST e LT. Para obtenção das enterotoxinas ST e LT, cada uma das 153 amostras de *E. coli* foi semeada em frascos Erlenmeyer contendo meio de Evans (4), estabelecendo sempre uma proporcionalidade de 1% em relação à quantidade de meio e o volume do frasco.

As culturas foram incubadas em estufa com agitação (150–200rpm) a 37°C por 18–24 horas. Para o preparo da enterotoxina LT foi utilizado a extração pela polimixina B, segundo técnica descrita por Evans & col. (5), sendo as culturas então centrifugadas a 4000rpm por 45 minutos e, após, retirados cuidadosamente os 3/4 superiores dos sobrenadantes. Estes foram examinados pelo teste de imuno-hemólise passiva (PIH) conforme descrito por Evans & col. (6) e modificado por Serafim & col. (17) e Castro & col. (1). Os valores com absorbância abaixo de 0,16 (<30µg de hemoglobina liberada), foram considerados negativos no teste do PIH e os valores acima de 30µg de hemoglobina liberada foram considerados positivos (1, 17).

A produção da enterotoxina ST foi realizada em cultura estacionária, obedecendo-se a mesma proporcionalidade entre volume de meio de Evans e volume dos frascos Erlenmeyers, sendo estes incubados a 37°C por 24 horas. Após a centrifugação das culturas, os sobrenadantes foram coletados conforme descrito para o preparo de LT. O ensaio para detecção da enterotoxina ST foi feito através da inoculação intra-gástrica em camundongos recém-nascidos, de 3 dias de idade, em número de 4 por amostra de *E. coli*, com 0,1ml do extrato bacteriano contendo azul de Evans à 2%, segundo método recomendado por Dean & col. (2). Após 4 horas, os animais foram sacrificados e as amostras que apresentaram a relação peso dos intestinos/peso das crianças (PI/PC) superiores a 0,085 foram considerados positivos, ou seja, produtores da enterotoxina ST.

A identificação dos sorogrupo clássicos de *E. coli* foram pesquisadas utilizando antíseros OK polivalentes (Difco Laboratories) e, se positivos, com os antíseros específicos, de mesma procedência.

A pesquisa de rotavírus nos espécimes de fezes foi feita pelos métodos de ELISA e contra-imunoeletroosmose, seguindo-se metodologia já descrita anteriormente (20, 22).

A detecção de enterovírus foi processada através da inoculação de fezes em cultura de células Vero e HEp 2 e camundongo recém-nascido (inoculação intra-cerebral). As culturas celulares e os animais inoculados foram observados durante duas semanas na procura de efeito citopático e sinais de doença, respectivamente. A identificação dos enterovírus isolados foi feita utilizando mistura de antísero (Lim. Beniesch Melnick) e antíseros específicos para echovírus e coxsackievírus fornecidos pelo "National Institute of Health" (N.I.H.), Bethesda, Maryland, USA.

A fim de excluir a possibilidade de helmintos e protozoários intestinais estarem envolvidos na etiologia das diarréias, a pesquisa destes agentes foi feita em todos os espécimes fecais através do exame parasitológico direto.

Resultados

Do total de 44 crianças com gastroenterite aguda detectaram-se enteropatógenos em 33 (75%) dos casos, dos quais 30,3% foram enterobactérias patogênicas, 39,4% rotavírus e enterovírus e 30,3% com etiologia mista (Tabela 1). Através da coprocultura isolaram-se 12% de colibacilos pertencentes aos sorogrupo enteropatogênicos clássicos de *E. coli*, 6% de *Salmonella*, 3% de *Shigella* e 9% de *E. coli* enterotoxigênica. Três pacientes com *Shigella* apresentaram um ou mais enteropatógenos, simultaneamente: *E. coli* clássica em um, *Giardia lamblia* em outro e em um terceiro *E. coli* enterotoxigênica e enterovírus. Três pacientes com *E. coli* enterotoxigênica e três com rotavírus apresentaram infecção mista com enterovírus; um caso de *E. coli* clássica estava associado com rotavírus. Entre as espécies de *Shigella*, *Sh. flexneri* foi a mais frequente, seguida de *Sh. sonnei*. Em relação aos sorogrupo enteropatogênicos clássicos de *E. coli*, 0111 e 0124 foram os mais frequentes, seguidos dos sorogrupo 055 e 086. *S. typhimurium* e *S. belem* estiveram presentes com um isolamento de cada. Não foram pesquisados *E. coli* enteroinvadora e *Campylobacter jejuni*.

e não foi isolada nenhuma amostra dos gêneros *Arizona* e *Yersinia*, apesar de já se ter detectado em oportunidade anterior (12) uma amostra de *Y. enterocolitica* (biotipo 1 e sorotipo 0:8) das fezes de uma criança com gastroenterite aguda em Belém do Pará.

Enterovírus foram isolados em 9 (20%) das 44 crianças com diarréia aguda; cinco foram identificados como echovírus (echo 1, echo 4, echo 14, echo 19 e echo 20) e os 4 restantes ainda não foram identificados até o momento.

O exame parasitológico das fezes, revelou a presença de *Giardia lamblia* em apenas um caso, o qual também alberga-va outro enteropatogênico.

Das 153 cepas de *E. coli* isoladas dos 44 casos de diarréia aguda e examinadas quanto à produção das enterotoxinas ST e LT, 13 amostras, isoladas de 4 pacientes, apresentaram a relação PI/PC superiores a 0,085 e foram consideradas positivas para ST (Tabela 2). Por outro lado, 4 amostras isoladas de 3 casos, foram capazes de produzir enterotoxina do tipo LT. Fato importante a considerar, foi que, nenhuma das amostras de *E. coli* foi capaz de produzir, simultaneamente, as enterotoxinas ST e LT.

Tabela 1 - Distribuição de enteropatogênicos isolados das fezes de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará

Etiologia	Casos de diarréia	%
	Nº	
Bacteriana	10	30,3
<i>E. coli</i> enteropatogênica		
clássica	4	
enterotoxigênica	3	
<i>Sh. flexneri</i>	1	
<i>S. bolem</i>	1	
<i>S. typhimurium</i>	1	
Viral	13	39,4
Rotavírus	11	
Enterovírus	2	
Mista	10	30,3
<i>Sh. flexneri</i> + <i>E. coli</i> clássica	1	
<i>Sh. flexneri</i> + <i>E. coli</i> enterotoxigênica + enterovírus	1	
<i>Sh. sonnei</i> + <i>G. lamblia</i>	1	
<i>E. coli</i> enterotoxigênica + enterovírus	3	
<i>E. coli</i> clássica + rotavírus	1	
rotavírus + enterovírus	3	
Total	33	100

Discussão

As diarréias continuam sendo a maior causa de mortalidade infantil nos países em desenvolvimento. Na África, Ásia e América Latina, são registrados, anualmente, mais de 500 milhões de casos em crianças menores de 5 anos de idade e cerca de 5 milhões de óbitos (7). Rotavírus e *E. coli* enterotoxigênica têm sido, juntos, incriminados como responsáveis por mais de 50% dos casos de diarréia em crianças abaixo de 5 anos de idade (24). Em nosso estudo verificamos que esses dois agentes causais de gastroenterite, estiveram presentes em 32% das situações além de 8 casos de infecção mista (Tabela 1).

O fato de que as cepas de *E. coli* enterotoxigênicas não terem sido capazes de produzir simultaneamente as enterotoxinas ST e LT, sugere ser frequente a produção isolada de enterotoxinas nas amostras de origem humana, em nosso meio. Serafim & col. (16), em São Paulo, isolaram 3 amostras de *E. coli* de pacientes com diarréia, que produziam somente enterotoxina ST. Magalhães & col. (13), no Recife, detectaram *E. coli* enterotoxigênica em sete (12%) crianças com diarréia. Entre as amostras isoladas 4 produziram somente enterotoxina ST, uma apenas enterotoxina LT e 2 produziram ambas enterotoxinas (ST e LT). Guigliano & col. (9), em Manaus, reportaram a ocorrência de *E. coli* enterotoxigênica em crianças sem sintomatologia gastrintestinal, quando estudaram 360 cepas de *E. coli* isoladas de 72 lactentes de um bairro de baixa renda da cidade de Manaus, sendo que em um dos casos as cepas isoladas fo-

ram capazes de produzir ambas enterotoxinas e, no outro, somente a enterotoxina ST (Tabela 2).

Atualmente a importância do encontro de amostras enterotoxigênicas de colibacilos que produzem exclusivamente a enterotoxina LT tem sido contestada por alguns autores (21), uma vez que estas amostras têm sido isoladas com frequências semelhantes de indivíduos normais e com diarréia. Por outro lado, tem se sugerido que o encontro de amostras ST+, principalmente se houver produção simultânea de LT, tem maior significação pois não ocorrem com frequência em indivíduos normais, sendo isoladas comumente de casos de diarréia (21).

Este aspecto de produção isolada de enterotoxinas, tem se repetido inclusive quando se investiga animais com diarréia. Simões (19) trabalhou com 700 amostras de *E. coli* isoladas de suínos com diarréia e 14 (2%) demonstraram produzir enterotoxina LT quando examinadas pelo ensaio de células da linhagem Y-1. Dentre 500 amostras das 700 isoladas, observou a existência de 23 (4,6%) colibacilos capazes de produzir a enterotoxina ST.

A associação entre dois ou mais agentes enteropatogênicos bem como a alta frequência com que se detectou rotavírus e em menor quantidade enterovírus sugerem, no concernente a Belém do Pará, que a etiologia das diarréias infantis nesta localidade, é bastante ampla, necessitando-se, pois, de infraestrutura diversificada capaz de incluir no diagnóstico etiológico, além das enterobactérias estudadas no presente trabalho, agentes virais tais como rotavírus e enterovírus. Salienta-se que a pesquisa de *Campylobacter jejuni*, não tendo sido realizada, poderia com grande probabilidade figurar entre os agentes pesquisados, uma vez que esta faixa etária parece ser mais sensível à infecção por esta bactéria (Loureiro, E.C.B. & Lins, Z.C. - Observações sobre o isolamento de *Campylobacter jejuni* de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. No prelo).

Os rotavírus isolados em 11 situações, assumem reconhecida importância (12) na etiologia das diarréias agudas. Já os enterovírus, detectados em 2 espécimes fecais, têm patogenicidade questionável, conforme alguns autores (14). Entre os agentes virais capazes de produzir gastroenterite aguda ainda figuram os "parvovirus-like" (11), cujo diagnóstico laboratorial requer métodos especializados como a imuno-microscopia eletrônica e a hemaglutinação por imuno-adherência, não disponíveis em nossa investigação.

Por outro lado, queremos colocar em evidência que o encontro de amostras enterotoxigênicas de colibacilos em fezes de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará, constitui-se na primeira detecção desta natureza na região Amazônica do Brasil.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Dra. Zéa Constante Lins pelo apoio recebido, aos Srs. Wanderley J. Ferraro e Raimundo Nonato Q. da Fonseca pela cooperação técnica, ao corpo médico e enfermeiras do Hospital da Santa Casa do Pará e ao Dr. Augusto Serruya pela colaboração no envio dos espécimes para exame e ao Dr. Ricardo Ishak pela revisão do manuscrito.

Tabela 2 - Frequência das amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas isoladas das fezes de crianças com gastroenterite aguda

Produção de enterotoxina	Teste utilizado	Nº de amostras examinadas	Nº amostras positivas (%)
LT	Imuno-hemólise passiva	153	04 (2,6)
ST	Camundongo recém-nascido	153	13 (8,5)

Referências Bibliográficas

1. Castro, A.F.P.; Serafim, M.B.; Gomes, J.A. & Gatti, M.S. - Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 12:714-717, 1980.
2. Dean, A.G.; Ching, Y.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
3. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Minnesota, Burgess Publishing, 1972.
4. Evans, 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.
5. Evans, D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. - Polymyxin B: induced release of low-molecular-weight, heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 10:1010-1017, 1974.
6. Evans, D.J. & Evans, D.G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*, using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16:604-609, 1977.
7. Fundação Serviços de Saúde Pública - Doenças diarréicas e reidratação. *Boletim Epidemiológico*, 13:53-57, 60, 1981. (Adaptação de "tratamento clínico da diarréia aguda". Grupo de trabalho científico da OMS, Doc. WHO/DDC/79.3. Original em inglês).
8. Giugliano, L.G.; Meneguetti, M.A.M. & Trabulsi, L.R. - Produção de enterotoxina LT por amostras de *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 9:11-17, 1978.
9. Giugliano, L.G.; Nakagima, G.S.; Giugliano, R. & Shrimpton, R. - *Escherichia coli* enterotoxigênica isolada de lactentes em Manaus, Amazonas, Brasil. *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 9:198-201, 1978.
10. Guerrant, R.L.; Moore, R.A.; Kirschenfeld, P.M. & Sande, M.A. - Role of toxicogenic and invasive bacteria in acute diarrhea of childhood. *N. Engl. J. Med.*, 293:567-573, 1975.
11. Kapikian, A.Z.; Wyatt, R.G.; Dolin, R.; Thornhill, T.S.; Kalica, A.R. & Chazlock, R.M. - Visualization by immune electron microscopy of a 27nm particle associated with acute infection non-bacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 10:1075-1081, 1972.
12. Linhares, A.C.; Loureiro, E.C.B.; Gabbay, I.B.; Monção, H.C.; Araújo, V.L.C.; Lins, Z.C.; Pinheiro, F.P. & Neto, H.F. - Pesquisas de agentes vírais, bacterianos e parasitários associados a diarréia infantil em Belém do Pará (Nota prévia). *Hiléia Médica (Belém)*, 2:59, 1980.
13. Magalhães, M.; Andrade, M. & Carvalho, A.E. - Pathogenic *Escherichia coli* associated with infantile diarrhea. *Rev. Microbiol. (S.Paulo)*, 12:38-41, 1981.
14. Ramos, A.M. & Olarte, J. - Diarrhoeal diseases of children. *Am. J. Dis. Child.*, 107:218-231, 1964.

15. Sack, B.R. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol., 29:333-353, 1975.
16. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Rangel, H.A. & Neto, L.P. - Isolation of heat-stable enterotoxin-producing strains of *Escherichia coli* isolated from cases of diarrhea in Campinas, SP, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. (S.Paulo), 19:144-147, 1977.
17. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Reis, M.H.L. & Trabulsi, L.R. - Passive immune hemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. Infect. Immun., 24:606-610, 1979.
18. Simões, M.; Serafim, M.B.; Rodrigues, A.C.; Giorgi, W.; Netto, L.P. & Castro, A.F.P. - Amostras de *Escherichia coli*, de origem animal, produtoras de enterotoxina termoestável (ST) isoladas de casos de diarréia em São Paulo, SP. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 8:143-144, 1977.
19. Simões, M. - Fatores de virulência e sensibilidade a drogas em colibacilos isolados de suínos com diarréia. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1979. (Tese de Mestrado).
20. Spence, L.; Fauvel, M.; Bouchard, S.; Pubuik, L. & Saunders, J.R. - Test for reovirus-like agent. Lancet, ii:322, 1975.
21. Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, 135p. Vol. 1 (Atualização em microbiologia clínica), 1981.
22. Voller, A.; Bartlett, A. & Bidwell, D. - Enzyme immunoassays with special reference to ELISA Technique. J. Clin. Path., 31:507-520, 1978.
23. WHO Scientific Working Group - *Escherichia coli* diarrhoea. Bull. Wld. Hlth. Org., 58:23-36, 1980.
24. World Health Organization - Diarrhoeal diseases in the Americas. Wkly. Epidemiol. Rec., 55:330-334, 1980.

YEASTS FROM BEACHES IN THE SOUTHERN AREA OF SÃO PAULO STATE
"BAIXADA SANTISTA", BRAZIL

Claudete R. de Paula
Adhemar Purchio
& Walderez Gambale

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

Summary

Several yeasts from the polluted beaches of São Vicente Island and not polluted ones of Bertioga were isolated and studied. From March to December of 1976, 181 samples of sea water were collected in nine places previously chosen. The total of 500 colonies of yeasts were distributed in nine genera: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* and *Sporobolomyces*. The results points the genus *Candida* as a probable pollution indicator for coastal sea water.

Resumo

Leveduras isoladas de praias da região sul do Estado de São Paulo, Brasil

Isolamento e identificação de leveduras em águas poluídas, de praias da Ilha de São Vicente e de águas não poluídas de praias de Bertioga. Através de 181 coletas de água do mar, de março a dezembro de 1976, foram isoladas 500 colônias de leveduras, distribuídas em nove gêneros: *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Pichia* e *Sporobolomyces*. Os resultados revelam a possibilidade de leveduras do gênero *Candida* serem um novo indicador de poluição em águas de estuários marinhos.

Introduction

Scientific knowledge on sea water yeast "habitat" grew very slowly, as represented by the few publications available. The first works of real importance appeared between 1960 and 1962 (1, 2, 7, 20). In 1968 and in 1975, Morris (17, 18) carefully revised the subject and discussed several important aspects such as: factors that influence in isolation and growth of the yeasts and problems concerning their classification. He also described the genera isolated from sea water, marine animals and plants: *Candida*, *Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hansenula*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces* and *Sporobolomyces*. In Brazil the study of sea water yeasts was done in Recife (19) and in Florianópolis (6).

With few exceptions the yeasts named from sea water have terrestrial counterparts

(17). Additionally, a considerable evidence that they are abundant on the coastal waters, due to soil dragging by rivers and channels as well as by the domestic and industrial residues, which add additional nutrients to the sea water (4, 5, 8, 9, 14, 21).

Yeasts in sea water participate of several ecologically remarkable processes, either when in estuary waters, due to their role on conversion of organic and inorganic substances, nutrient recycling, biodegradation of oil and the recalcitrant mixtures, or when in parasitism of marine animals (16).

The so-called "Baixada Santista" is located in the southern area of São Paulo State littoral, is important because of the serious problems of pollution, affecting the main public beaches. There are no specific data on the incidence of the yeasts in the area.

Based on frequencies and generic occurrence in both polluted (São Vicente Island) and non-polluted (Bertioga) beaches, the following data were recorded in relation to the seasons of 1976.

Material and Methods

The localization of the sampling stations are demonstrated in Figures 1 and 2 and Tables 1 and 2.

The total of 181 samples of 200ml of sea water was collected from March to December, 1976. Due to the lack of standard techniques, isolation procedures were established after assays aiming to low cost and high field efficiency, as follows: isolation on Sabouraud dextrose agar (DIFCO) plus yeast extract (0.5%), with Chloramphenicol (100 μ g/ml), adjusted to final pH 5.0; plating with aliquots of 0.2ml, followed by the incubation at 25°C, for 5 to 15 days. Identification of morphologically representative yeast colonies, was based on Lodder (13).

The χ^2 test was applied for analysis of the quantitative differences between the beaches studied.

Results

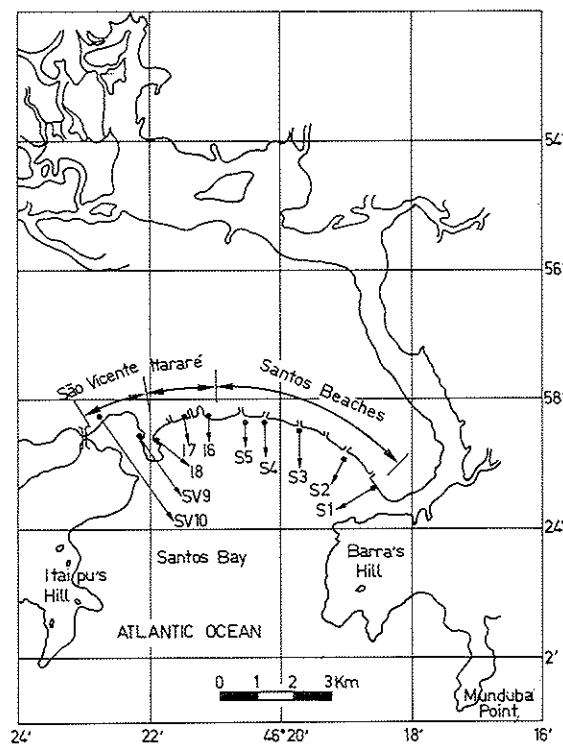
The relative frequency of the yeasts in SVI was of 58% and in the beaches of Bertioga was 34.5% (Table 3).

Submitting these percentages to the χ^2 distribution, the results are 8.9 and 6.64 ($p = 1\%$), that is, $8.9 > 6.64$ (difference statistically significant).

Absolute and relative frequencies of yeasts isolated from the beaches of São Vicente Island and Bertioga are expressed in Tables 4 and 5.

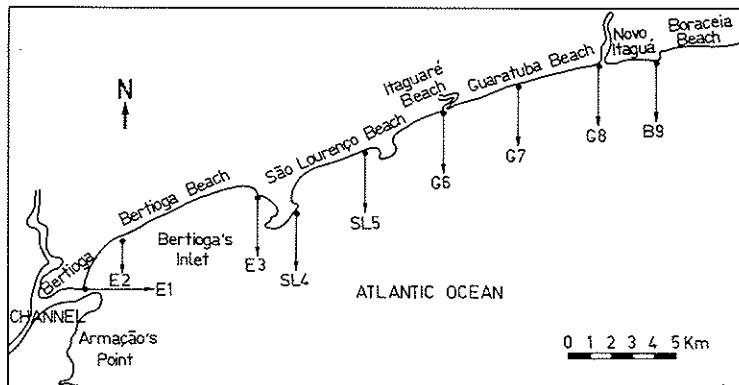
In SVI, nine genera were isolated: five asporogenous, three ascosporogenous and

Figure 1 - Sampling stations in São Vicente Island beaches



one ballistospore producer. In Bertioga beaches, six genera were found: five asporogenous and one ascosporogenous.

Figure 2 - Sampling stations in Bertioga beaches



The genera *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* and *Debaryomyces* were isolated in both places; *Pichia*, *Sporobolomyces* and *Hansenula* were found only in SVI. *Candida*, *Rhodotorula* and *Torulopsis* showed higher frequencies in both places.

Table 1 - Localization of the sampling stations in São Vicente Island (Santos, Itararé and São Vicente)*

Place	Beach	Sampling Stations
S1	Ponta da Praia	400 meters left from channel 6 (entrance of the estuary)
S2	Aparecida	In front of channel 5
S3	Boqueirão	In front of channel 3
S4	Gonzaga	In front of channel 2
S5	José Menino	80 meters on the left of the cut-fall in construction
I6	Itararé	100 meters at right of "Pedra da Feiticeira"
I7	Itararé	In front of point 2
I8	Itararé	In front of Saldanha da Gama Street
SV9	São Vicente	On the right of the avenue which connects with Porchart Island
SV10	São Vicente	In front of the small fountains, 20 meters far from the Fourth Centenary monument

* Beaches considered as improper for sea-bathing (suspect and bad), according to CETESB - Company of Basic Sanitation.

The isolation of *Candida* (33% in SVI and 12.34% in Bertioga) also shows a difference statistically significant: 10.01 and 6.64 ($p = 1\%$), that is $10.01 > 6.64$.

Distribution of the genera of the yeasts according to climatic seasons - São Vicente Island beaches - The highest number genera isolated (Table 6) took place in winter (eight), followed by autumn (seven), spring (five) and summer (one). *Candida* was the only genus occurring in the summer.

Table 2 - Localization of the sampling stations in Bertioga*

Place	Beach	Sampling stations
E1	Enseada	In front of Bertioga's G.E.
E2	Enseada	In front of S.E.S.C.'s sea-side resort
E3	Enseada	100 meters before the end of the beach (South)
SL4	São Lourenço	100 meters before the end of the beach (South)
SL5	São Lourenço	100 meters from the end of the beach (North)
G6	Guaratuba	100 meters from the start of the beach (South)
G7	Guaratuba	In the middle of the beach
G8	Guaratuba	100 meters from the end of the beach (North)
B9	Boracéia	100 meters from the start of the beach (South)

Table 3 - Frequency concerning the isolation of genera of yeasts in sea waters

Place	Nº of collections	%
São Vicente Island	100	58.00
Bertioga	81	34.40
Total	181	47.50

* Beaches considered as proper sea-bathing (excellent and very good), by CETESB - Company of Basic Sanitation.

Hansenula was found only in the winter and *Sporobolomyces* only in the spring. The highest frequencies in autumn (43.33%), spring (36.66%) and summer (30%) were shown by *Candida*; in the winter, was by *Torulopsis* (26.66%).

Bertioga beaches - Of the six genera, five were isolated in autumn and winter, four in the spring and two in the summer (Table 6).

Candida and *Rhodotorula* were found in all seasons; *Debaryomyces* was isolated only in the autumn.

In spring and summer, *Rhodotorula* was the only genus with the highest frequencies (11.11% and 33.33%, respectively); in the autumn, it was the *Candida* genus (33.33%); and in the winter, *Torulopsis* (11.11%).

Discussion

The total percentage of isolation (58% in the São Vicente Island and 34.4% in Bertioga), as well as the number of isolated genera (nine in SVI and six in Bertioga), indicate the better adaptation of the yeasts in the water of SVI beaches than in the water of Bertioga beaches (Tables 3, 4, 5).

Table 4 - Frequencies of the genera of yeasts isolated in different sampling stations of São Vicente Island beaches*

Genera	Sampling stations										% =
	S1	S2	S3	S4	S5	I6	I7	I8	SV9	SV10	
<i>Candida</i>	7	4	4	4	2	4	2	1	1	4	33
<i>Rhodotorula</i>	1	3	1	0	1	2	2	1	2	4	17
<i>Torulopsis</i>	2	2	2	2	0	4	0	0	2	1	15
<i>Cryptococcus</i>	2	0	0	0	1	1	1	3	0	0	8
<i>Trichosporon</i>	3	1	0	1	0	0	0	2	0	0	7
<i>Pichia</i>	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	3
<i>Debaryomyces</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2
<i>Sporobolomyces</i>	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	2
<i>Hansenula</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1

* Ten samples from each station totaling 100 samples.

This view is supported by factors such as the great populational density of the São Vicente Island and the consequent higher volume of organic substances, whose association with the yeasts was already confirmed (9, 14, 21).

Waters highly polluted by domestic wastewater have large number of species of *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis* and *Rhodotorula* (8, 16). The study made it evident that *Trichosporon* is not well adapted to sea water (Tables 4 and 5).

Species of *Rhodotorula* and *Torulopsis* are usually found in all sea environments (2, 4, 15, 17, 22), which was confirmed in this study.

Cryptococcus has been reported as predominant in non polluted waters (10, 11, 12). This is contradicted by the present results, for this genus was isolated several times in SVI. Ahearn (4) says that this is the most common genus, but not the most frequent one in clean waters.

Table 6 - Seasonal variation of the genera of yeasts isolated in the sea water of São Vicente Island and Bertioga (relative frequency)

Genera	Climatic seasons sampling stations/samples	Spring		Summer		Autumn		Winter	
		SVI/30	BE/27	SVI/10	BE/9	SVI/30	BE/18	SVI/30	BE/27
<i>Candida</i>		36.66	7.40	30.00	11.11	43.33	33.33	20.00	3.70
<i>Torulopsis</i>		-	7.40	-	-	23.33	11.11	26.66	11.11
<i>Rhodotorula</i>		26.66	11.11	-	33.33	16.66	11.11	13.33	7.40
<i>Trichosporon</i>		13.33	7.40	-	-	3.33	-	6.66	3.90
<i>Cryptococcus</i>		10.00	-	-	-	10.00	5.55	6.66	3.90
<i>Debaryomyces</i>		-	-	-	-	3.33	22.22	3.33	-
<i>Hansenula</i>		-	-	-	-	-	-	3.33	-
<i>Pichia</i>		-	-	-	-	6.66	-	3.33	-
<i>Sporobolomyces</i>		6.66	-	-	-	-	-	-	-

SVI = São Vicente Island; BE = Bertioga.

Among the ascosporogenous genus, *Debaryomyces* presented the highest frequency. This is justified by its presence on thick secretions and fishes excrements (18) or for being an homothallic species the commonest isolated, *Debaryomyces hansenii*, because in sea water the chance of sexual conjugation is small, due to the microbiota dispersion.

Candida deserves special reference, for it presented the highest frequencies, in both collecting sites. Its predominance in waters of the SVI matches the results of Ahearn (4), who observed the influence of the sewage of the biggest urban centres in the United States in the occurrence of several species of the quoted genus which has been found high concentrations in the sewage.

Table 5 - Frequencies of the genera of yeasts isolated in different sampling stations of Bertioga beaches*

Genera	Sampling stations									F	%
	E1	E2	E3	SL4	SLS	G6	G7	G8	B9		
<i>Candida</i>	2	0	1	1	2	2	0	1	1	10	12.34
<i>Rhodotorula</i>	1	0	3	0	0	1	2	2	1	10	12.34
<i>Torulopsis</i>	1	1	2	1	0	0	0	0	2	7	8.84
<i>Debaryomyces</i>	0	0	0	0	2	0	1	0	1	4	4.93
<i>Trichosporon</i>	1	1	0	0	1	0	0	0	0	3	3.90
<i>Cryptococcus</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	2	2.46

* Nine samples from each station totaling 81 samples.

These results also coincide with others authors (3, 8, 16, 19) which confirm the high incidence of *Candida* in polluted waters by domestic sewage.

In waters of the highly polluted beaches of the island, there is high number of fecal coliforms (data obtained from CETESB - Table 7) and the highest frequency of yeasts, especially of *Candida*. This does not occur in non-polluted waters of Bertioga beaches.

The quantitative comparison between the waters of both places shows a remarkable difference between the percentage of the yeasts isolation in the island (58%) and in Bertioga (34.4%). As demonstrated in Results, this confirms the ecological difference, as not a mere observation, but a statistically significant fact.

The isolation of *Candida*, as also demonstrated in Results, showed a difference statistically significant. Therefore the highest frequency found in SVI waters is not purely casual.

The seasonal variation of *Candida* (Table 6) followed the fecal coliforms (Table 7) and the non sporulating fungi - NSF (Purchio, A. - personal communication), in the island waters, which means: smaller frequencies in winter and summer and maximum frequencies in the autumn (Figure 3).

Based on the present results, *Candida* is proposed as a new pollution indicator for coastal sea water.

Acknowledgements

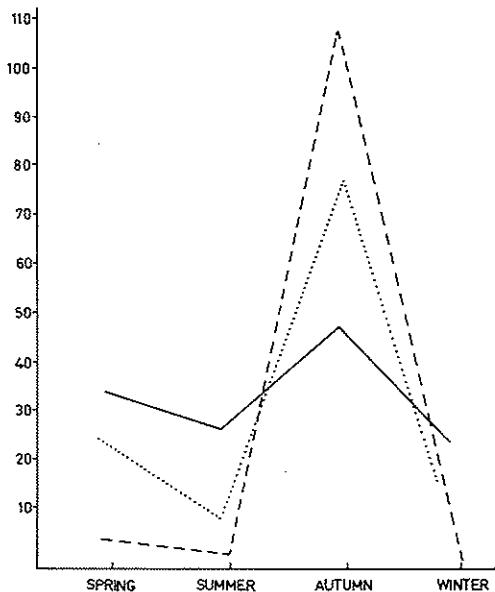
The authors wish to thank CETESB (Company of Basic Sanitation) and Dr. Maria Therezinha Martins, for the water-samples and information concerning the beaches of "Baixada Santista".

Table 7 - Seasonal distribution of media (N.M.P./100ml) of fecal coliform isolated in the same sampling stations in the São Vicente Island and Bertioga*

Stations	Spring	Summer	Autumn	Winter
São Vicente Island	54×10^3	16×10^3	1.095×10^3	15×10^3
Bertioga	174	75	56	228

* Data obtained from CETESB (Company of Basic Sanitation).

Figure 3 - Seasonal distribution of *Candida*, fecal coliforms and non sporulated fungi (NSF) in the sea water of São Vicente Island



— Relative media frequencies of genus *Candida*; - - - Media of the fecal coliforms (NMP/100ml): 10^4 ; ... Relative media frequencies of NSF.

References

1. Ahearn, D.G. & Roth Jr., F.J. - Vitamin requirements of marine occurring yeasts. *Dev. Ind. Microbiol.*, 3:163-173, 1962.
2. Ahearn, D.G. ; Roth Jr., F.J. & Meyers, S.P. - A comparative study of marine and terrestrial strains of *Rhodotorula*. *Can. J. Microbiol.*, 8:121-132, 1962.
3. Ahearn, D.G.; Roth Jr., F.J. & Meyers, S.P. - Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of South Florida. *Mar. Biol. (N.Y.)*, 1:291-308, 1968.
4. Ahearn, D.G. - Effects of environmental stress of aquatic yeasts population. In: - Bella, W. - Baruch Symposium in Marine Science: estuarine microbiological ecology. Columbia, University of South Caroline Press, 1973.
5. Cooke, B.W.; Phaff, H.J.; Miller, M.W.; Shifrine, M. & Knapp, E.P. - Yeasts in polluted water and sewage. *Mycologia*, 52:210-220, 1960.
6. Faraco, B.F.C. & Faraco, B.A. - Poluição hídrica micológica. *Rev. Bras. Med.*, 33:210-220, 1960.
7. Fell, J.W.; Ahearn, D.G.; Meyers, P.S. & Roth Jr., F.G. - Isolation of yeasts from Biscayne Bay - Florida and adjacent benthic areas. *Limnol. Oceanogr.*, 5:366-371, 1960.
8. Fell, J.W. & van Uden, N. - Yeasts in marine environments. In: - Oppenheimer, C.H. - Symposium on marine microbiology. Springfield, Charles C. Thomas, p. 329-340, 1963.
9. Fell, J.W. - Distribution of yeasts in the Indian Ocean. *Bull. Mar. Sci.*, 17:455-470, 1967.
10. Hendrick, L.R. & Soyugenc, M. - Yeasts recovered in mud samples from Lake Michigan. *Proc. Conf. Great Lakes Res.*, 8:69-76, 1965.
11. Hendrick, L.R. & Soyugenc, M. - Yeasts and molds in water and sediments of lake Ontario. *Proc. Conf. Great Lakes Res.*, 10:20-30, 1967. .
12. Hendrick, L.R.; Cook, W. & Wollet, L. - Yeasts and molds in Lake Superior water and some of its tributaries. *Proc. Conf. Great Lakes Res.*, 11:538-543, 1968.
13. Lodder, J. - The yeasts: a taxonomic study. 2.ed. Amsterdam, North Holland, 1970.
14. Meyers, S.P.; Ahearn, D.G.; Grunkel, W. & Roth Jr., F.J. - Yeasts from the North Sea. *Mar. Biol. (N.Y.)*, 1:118-123, 1967.
15. Meyers, S.P.; Ahearn, D.G. & Roth Jr., F.J. - Mycological investigations of the Black Sea. *Bull. Mar. Sci.*, 17:579-596, 1967.
16. Meyers, S.P. & Ahearn, D.G. - Implications of yeasts and yeast-like fungi in marine processes. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerhaven Suppl.*, 5:321-338, 1974.
17. Morris, E.O. - Yeasts of marine origin. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 6:201-230, 1968.
18. Morris, E.O. - Yeasts from the marine environment. *J. Appl. Bacteriol.*, 38:211-223, 1975.

19. Queiroz, L.E. - Análise quantitativa e qualitativa de leveduras isoladas de águas marinhas. I - Recife, Instituto de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco, publ. 677, 1972.
20. Roth Jr., F.J.; Ahearn, D.G.; Fell, J.W.; Meyers, S.P. & Meyers, S.A. - Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. Limnol. Oceanogr., 7:178-185, 1962.
21. Spencer, J.E.T.; Goun, J. & Gardner, N.R. - Yeasts isolated from the South Saskatchewan a polluted river. Can. J. Microbiol., 16:1051-1057, 1970.
22. Uden, N. van & Castelo Branco, R. - Distribution and population densities of yeast species in Pacific water, air, animals and help off Southern California. Limnol. Oceanogr., 8:323-329, 1963.

A SCREENING OF RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS IN STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Márcia Giambiagi
Alba Lúcia S. Noleto
& Elisa Gastão da Cunha Penido

Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

A survey of 137 *Staphylococcus aureus* strains isolated from outpatients and from food indicated a high percentage of resistance to penicillin G, and a variable one to erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, kanamycin, amikacin, sulfadiazine and streptomycin. One strain produced enterotoxin B and 9 produced enterotoxin C. Staphylococcinal agents were detected in 13 strains.

Resumo

Triagem da resistência e de fatores de virulência em Staphylococcus aureus

O estudo de 137 estirpes de *Staphylococcus aureus*, recentemente isoladas de pacientes não hospitalizados e de alimentos, mostrou alta percentagem de resistência à penicilina G e percentual variável à eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, canamicina, amicacina, sulfadiazina e estreptomicina. Uma estirpe produziu enterotoxina B e mal produziram enterotoxina C. Agentes estafilococcinogênicos foram detectados em 13 estirpes.

Introduction

In Brazil, *Staphylococcus aureus* has been little studied as a food contaminant or as a constituent of the resident or transient flora of outpatients. More emphasis has been given to samples obtained from inpatients which had been frequently submitted to antibiotics treatments.

The high number of antibiotics freely available for sale and their overuse in Brazil has led to the increase of resistant strains. However, the high number of resistant clones cannot be explained only by the process of resistant mutants selection. The progressive increase of *S. aureus* resistance can also be attributed to the phenomena of genetic recombination through transduction, transformation or through a mechanism detected in mixed cultures and not yet well understood (10, 11, 13, 16, 18, 19).

References from literature (14) show that some drug resistance genes are located in the staphylococcal chromosome. These include genes coding for resistance to streptomycin (high level), trimethoprim, novobiocin and rifampicin. Determinants for other antibiotic resistances including resistance to penicillin, streptomycin

(low level), kanamycin/neomycin, chloramphenicol, erythromycin/lincomycin are located in plasmids. Resistance to still other antibiotics such as fusidic acid and tetracycline can be coded for by genes localized either in plasmids or in the chromosome (2). The location of some resistance genes is still controversial (e.g. for methicillin and gentamycin resistance).

The high number of available antibiotics with similar structure, has raised doubts on the therapeutic value of some of them. Thus, the penicillinase producing strains of *S. aureus* hydrolyze the β -lactam ring of several antimicrobial agents like carbenicillin, cloxacillin, flucloxacillin, ampicillin, amoxicillin, cephaloridine, cephalothin and others. In countries where these antibiotics have been employed in the past, they are being increasingly substituted by β -lactamase resistant ones, but bacterial strains resistant to any antibiotic will eventually emerge. In the United Kingdom, bacteria resistant to neomycin were detected 9 years after the introduction of this antibiotic (12). Moreover, in the United Kingdom and in the United States, several strains resistant to gentamycin, recently introduced antibiotic have been isolated (29). However, in Brazil such clones have only occasionally been detected among isolated *S. aureus* strains.

In *S. aureus* 6 different enterotoxins have been characterized (3, 4) which may cause food poisoning in man. These exotoxins may be present in culture filtrates and can also be detected in contaminated food. They cause a short sickness (1 to 6 hours) characterized by vomiting and diarrhea. The staphylococcal enterotoxins (A, B, C, D, E, F) are immunologically distinct, and can be detected by using specific antisera. Enterotoxin A is the most commonly isolated from patients with those symptoms. In the few strains already studied, enterotoxin A seems to be coded for by genes located in the chromosome (17, 20, 25). The genes that code for enterotoxin B are in some cases chromosomal (24), but in other strains they are plasmid-borne (5, 7, 8, 27, 28).

Some *S. aureus* strains exert an antagonistic action on others, and also on related species. The responsible agents may be lytic enzymes, antibiotics, phages or staphylococcal bacteriocins (staphylococcins). Initial studies on bacteriocins were done in Gram negative bacteria, mainly in *Escherichia coli*, being therefore named colicins. Bacteriocins are proteins or proteins complexed with lipids and carbohydrates with bactericidal action that bind to specific receptors, showing a narrow killing spectrum in homologous species and conferring immunity to the producing strain. In Gram positive bacteria the bacteriocin killing spectrum is usually wider. Bacteriocins are generally coded of plasmids. The staphylococcins are heat-stable proteins, which are capable of lysing unrelated species of Gram positive bacteria (9). Their genes apparently are also plasmid-borne, since they are cured with high frequency by ethyldium bromide, rifampicin or high temperature. However, genetics studies have been postponed because of the difficulty of selecting recombinant clones.

The aim of this work was to screen 137 newly isolated strains of *S. aureus* (1980) for their resistance pattern against 14 antibiotics, their enterotoxin production and their staphylococcinal action.

Material and Methods

Bacterial strains - 67 *S. aureus* strains designated Hu, newly isolated from skin, nose or throat of outpatients of two Children's Hospitals in Rio de Janeiro. 70 *S. aureus* strains designated A1, newly isolated from commercialized food.

Bacteriocin producers UT0007, UT0002 and indicator strain UT0017 were kindly provided by Dr. M. Rogolsky (University of Missouri, Kansas City).

Routine tests showed that all the used strains were coagulase, DNase and mannitol positive.

Media - Difco Vogel Johnson medium (for selection); nutrient broth and agar (for ordinary growth); Difco Mueller-Hinton agar (for antibiograms); sheep blood (5%) nutrient agar and Oxoid Brain Heart Infusion - BHI (for bacteriocin detection).

Antibiogram - Antibiograms were made in Mueller-Hinton agar plates by the method of Kirby & Bauer using an overlay of soft agar seeded with 0.2ml of an overnight nutrient broth culture. Antibiotic containing disks (Difco) were applied with a dispenser. The following antibiotics were used: amikacin (Ak: 10 μ g), bacitracin (Ba: 10U), cephalothin (Cr: 30 μ g), chloramphenicol (Cm: 30 μ g), erythromycin (Em: 15 μ g), gentamycin (Gm: 10 μ g), kanamycin (Km: 30 μ g), nalidixic acid (Na: 30 μ g), penicillin G (Pc: 5U), polymyxin B (PB: 300U), rifampicin (Ra: 5 μ g), streptomycin (Sm: 10 μ g), sulfadiazine (Su: 300 μ g), tetracycline (Tc: 30 μ g). Results were read after 24h of incubation at 37°C. The sensitivity criterion used was that described by Rocha & col. (22).

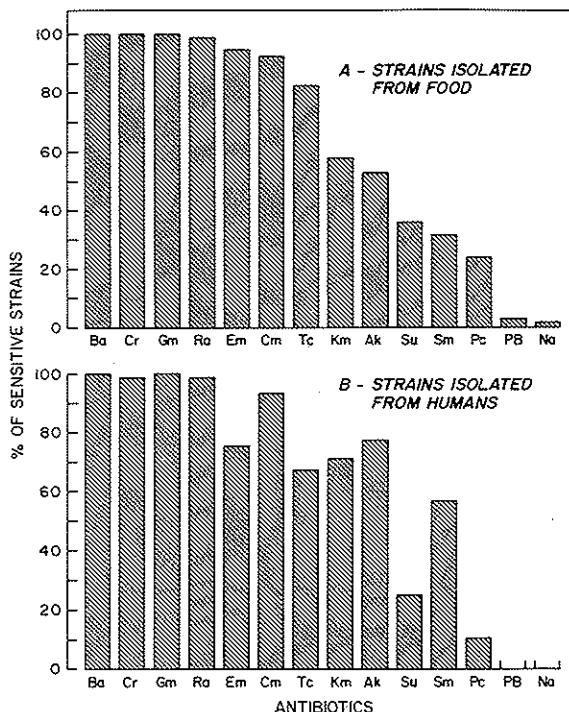
Enterotoxin production - The Optimal Sensitivity Plate (O.S.P.) double diffusion method as described by Robbins & col. (21) was employed using the supernatants of overnight cultures grown on nutrient broth. Anti A, B, C, D and E sera were kindly provided by Dr. M. Bergdoll (University of Wisconsin, Madison). Readings were done after 24h and rechecked at 48h. The 70 strains isolated from food were checked for enterotoxin production.

Bacteriocin detection - The technique previously described by Anthony & col. (1) was used with the following modifications: lawns of indicator strain UT0017 (diluted 1:100) were poured on BHI agar instead of blood agar plates. All 137 strains were checked for bacteriocin production.

Results and Discussion

Almost all strains from both origins were sensitive to bacitracin, cephalothin, gentamycin and rifampicin (Fig. 1). The reduced therapeutic use of gentamycin and rifampicin and the topical use of bacitracin, may explain the high percentage of sensitivity to these antibiotics shown by the *S. aureus* strains. Such sensitivity to cephalothin remains unexplained, since according to literature (23) cephalosporins are hydrolyzed by the β -lactamases (produced by 80-90% of our samples); the only exception described in literature is cephadrine (15, 23) which resists the action of the penicillinases and was not used in this work. Among the isolates, a variable percentage (between 31.4 and 94.2) was sensitive to the following antibiotics: erythromycin, chloramphenicol, tetracycline, kanamycin, amikacin, sulfadiazine and streptomycin; only in the case of chloramphenicol the sensitivity of the strains isolated from humans and from food was similar. A higher percentage of

Figure 1 - Percentage sensitivity of *Staphylococcus aureus* to several antibiotics



Legends: for symbols see Material and Methods.

strains sensitive to erythromycin, tetracycline and sulfadiazine was found among the strains isolated from food, whereas sensitivity to kanamycin, amikacin and streptomycin was more common among strains isolated from humans. These facts can be explained by the different selective environments from which these two groups of *S. aureus* strains were isolated. Sensitivity to penicillin G was found to be rare (24.2 and 10.4%); these data agree with the literature, and even higher resistance percentages were found in *S. aureus* isolated in hospitals and nurseries. Although the use of penicillins may favour the appearance of methicillin resistant strains, our results (data not shown) indicate very few ones. The high resistances to polymyxin B and nalidixic acid (100% of resistance was found among samples isolated from humans) show the inadequacy of both antibiotics to kill *S. aureus*: polymyxin acts only on the cell membrane and the resistance of *S. aureus* to nalidixic acid is widespread although it acts at the DNA replication level.

Enterotoxin production was checked only among strains isolated from food. None of these strains produced enterotoxin A. Only one strain (1.4%) produced enterotoxin B. Data from literature (5, 6, 7, 25, 26) suggest that this marker can be located either in plasmids or in the chromosome. In about one third of the (few) analysed strains the gene was plasmidial and these strains were all resistant to methicillin; in the remainder enterotoxin B was coded for by a chromosomal gene and these strains were found to be either sensitive or resistant to methicillin (27). Some plasmids coding for enterotoxin production have already been characterized. Thus, a plasmid of 0.75×10^6 daltons was described as coding for enterotoxin B production; it was suggested to be dependent on a tetracycline resistance plasmid also present in the cell (28). In another strain studied for enterotoxin B production, a plasmid of 1.15×10^6 daltons was involved (27); this plasmid was absent in all the chromosomal producers. More studies (8) showed that this plasmid does not have a structural function but exerts regulatory action on enterotoxin B production. Of our isolates, nine (12.8%) produced enterotoxin C: all of them were penicillin resistant and one was also tetracycline resistant. Studies on the location of the genes coding for enterotoxin C are just beginning.

Thirteen strains produced staphylococcal agents (not yet fully characterized as staphylococcins). Reference strain UT0007 was reported to harbour a plasmid that codes both of bacteriocin production and for exfoliative toxin (31). According to literature (30) the size of this plasmid was 33×10^6 daltons.

Acknowledgements

We thank M.C. Bonaldo, M.M. Costa and H.S.R. Pereira for their valuable help with the antibiograms.

The receipt of grants from the National Research Council of Brazil (CNPq) is gratefully acknowledged.

References

1. Anthony, B.F.; Giuliano, D.M. & O.W. - Nursery outbreak of staphylococcal scalded skin syndrome: rapid identification of the epidemic bacterial strain. Amer. J. Dis. Child., 124:41-44, 1972.
2. Asheshov, E.H. - The genetics of tetracycline resistance in *S. aureus*. J. Gen. Microbiol., 88:132-140, 1975.
3. Bergdoll, M.S. - The staphylococci. New York, Wiley Interscience, 1972.
4. Bergdoll, M.S.; Crass, B.A.; Reiser, R.A.; Robbins, R.M. & Davis, J.P. - A new staphylococcal enterotoxin, enterotoxin F, associated with toxic-shock syndrome *Staphylococcus aureus* isolates. Lancet, i:1017-1021, 1981.

5. Dornbusch, K.; Hallander, H.O. & Löfquist, F. - Extrachromosomal control of methicillin resistance and toxin production in *S. aureus*. *J. Bacteriol.*, 98:351-358, 1969.
6. Dornbusch, K. - Genetic aspects of methicillin resistance and toxin production in a strain of *S. aureus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182:91-97, 1971.
7. Dornbusch, K. & Hallander, H.O. - Transduction of penicillinase production and methicillin resistance: enterotoxin B production in strains of *S. aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 76:1-11, 1973.
8. Dyer, D. & Iandolo, J.J. - Plasmid chromosomal transition of genes important in staphylococcal enterotoxin B expression. *Infect. Immun.*, 32:450-458, 1981.
9. Jetten, A.M. & Vogels, G.D. - Characterization and extrachromosomal control of bacteriocin production in *S. aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4:49-57, 1973.
10. Lacey, R. W. - Transfer of tetracycline: resistance between strains of *S. aureus* in mixed cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 69:229-237, 1971.
11. Lacey, R.W. - Transfer of chromosomal genes between staphylococci in mixed cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 71:399-401, 1972.
12. Lacey, R.W. - Genetic basis, epidemiology and future significance of antibiotic resistance in *S. aureus*: a review. *J. Clin. Path.*, 26:899-913, 1973.
13. Lacey, R.W. & Richmond, M.H. - The genetic basis of antibiotic resistance in *S. aureus*: the importance of gene transfer in the evolution of this organism in the hospital environment. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 236:395-412, 1974.
14. Lacey, R.W. - Antibiotic resistance plasmid of *S. aureus* and their clinical importance. *Bacteriol. Rev.*, 39:1-32, 1975.
15. Lacey, R.W. & Lewis, E.L. - Inativação de penicilinas penicillinase-resistentes e cefalosporinas pela penicillinase estafilocócica: estudos clínicos e laboratoriais. 3º Simp. Int. *Staphylococcus*, Varsóvia, Setembro 1975.
16. Lacey, R.W. - Evidence for two mechanisms of plasmid transfer in mixed cultures of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 119:423-435, 1980.
17. Mallonee, D.H.; Glatz, B.A. & Pattee, P.A. - Chromosomal mapping of a gene affecting enterotoxin A production in *S. aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:397-402, 1982.
18. Novick, R.P. - Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 33:210-263, 1969.
19. Novick, R.P. & Bouanchaud, D. - Extrachromosomal nature of drug resistance in *S. aureus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182:279-294, 1971.
20. Pattee, P.A. & Glatz, B.A. - Identification of a chromosomal determinant of enterotoxin A production in *S. aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:186-193, 1980.
21. Robbins, R.; Gould, S. & Bergdoll, M. - Detecting the enterotoxigenicity of *S. aureus* strain. *Appl. Microbiol.*, 28:946-950, 1974.

22. Rocha, H.; Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.E. - Antibiograma. Rev. Microbiol., 3:51-60, 1972.
23. Selwyn, S. - Susceptibility of penicillins and cephalosporins to β -lactamases assessed by a new test. J. Antimicrob. Chemother., 3:161-168, 1977.
24. Shafer, W.M. & Iandolo, J.J. - Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin B. Infect. Immun., 20:273-278, 1978.
25. Shafer, W.M. & Iandolo, J.J. - Staphylococcal enterotoxin A: a chromosomal gene product. App. Environ. Microbiol., 36:389-391, 1978.
26. Shafer, W.M. & Iandolo, J.J. - Genetics of staphylococcal enterotoxin B in methicillin resistant isolates of *S. aureus*. Infect. Immun., 25:902-911, 1979.
27. Shafer, W.M. & Iandolo, J.J. - Transduction of staphylococcal enterotoxin B synthesis: establishment of the toxin gene in a recombination-deficient mutant. Infect. Immun., 27:280-282, 1980.
28. Shalita, Z.; Hertman, I. & Sarid, S. - Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin B production in *S. aureus*. J. Bacteriol., 129:317-325, 1977.
29. Soussy, C.J.; Bouanchaud, D.H.; Fouace, J.; Dublanchet, A. & Duval, J. - A gentamycin resistance plasmid in *S. aureus*. Ann. Microbiol., 126B:91-94, 1975.
30. Warren, R.; Rogolsky, M.; Wiley, B. & Glasgow, L. - Isolation of extrachromosomal DNA for exfoliative toxin production from phage group II. J. Bacteriol., 122:99-105, 1975.
31. Wiley, B.B.; Glasgow, L.A. & Rogolsky, M.S. - Studies on staphylococcal skin syndrome: isolation and purification of toxin and development of a radioimmunobinding assay for antibodies to exfoliative toxin. Zentralb. Bakteriol. Parasit. Infekt. Hyg., 1:499-516, 1976.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Iizuka, H. & Naito A. - Microbial conversion of steroids and alkaloids. Japan, University of Tokyo Press, 396p., 1981.

Poucas são as obras que tratam especificamente das transformações de derivados do ciclopentanoperihidrofenantreno e de outras moléculas complexas por microrganismos.

O mais conhecido é o de Charney & Herzog, "Microbial transformations of steroids", publicado em 1967.

Em língua portuguesa há um pequeno capítulo de revisão no volume 1 de 1975 (Tecnologia das fermentações) da coleção Biotecnologia: Aquarone, E. & Stonis S. - Transformações de esteróides.

Este livro de Iizuka & Naito é uma complementação de outro de 1967, intitulado "Microbial transformation of steroids and alkaloids".

Divide-se em 8 capítulos: Conversão microbiana de hormônios esteróides, o mais longo; Conversão microbiana de ácidos biliares; Conversão microbiana de esteróides; Conversão microbiana de sapogeninas; Conversão microbiana de cardenólidos; Conversão microbiana de alcalóides; Conversão de hormônios esteróides por cultura de células de plantas e Conversão de cardenólidos por cultura de células de plantas.

É curioso nesta obra que, como num dicionário, cada um destes capítulos contém somente o nome do microrganismo (em ordem alfabética), a referência bibliográfica e as reações químicas de transformação com os nomes das substâncias respectivas, bem como a porcentagem de rendimento do produto; nos dois últimos capítulos, naturalmente, no lugar do microrganismo está o da planta.

Esta é mais uma útil originalidade deste livro em relação ao de Charney & Herzog: a inclusão de trabalhos sobre cultura celular de plantas superiores.

Deve-se ressaltar que das mais de 300 referências que contém este livro, somente 5 estão também na obra de Charney & Herzog citada. Isto dá uma demonstração de atualidade da obra, com informações bastante recentes de trabalhos de todo mundo sobre o assunto. Lamentavelmente, o livro anterior dos mesmos autores não existe à disposição em biblioteca nacional.

"Microbial conversion of steroids and alkaloids" é pois, um magnífico "abstract" resumido, contendo os trabalhos mais modernos em sua área. O interessado, após consultá-lo, deve ir à revista fonte indicada para obter as informações detalhadas sobre o assunto pesquisado.

Eugenio Aquarone
Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Caixa Postal 30786
01000 São Paulo SP

Sato, G.H.; Pardee, A.B. & Sirbasku, D.A., eds. - Growth of cells in hormonally defined media. New York, Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, vol. 9 A/B, 624p., 1982.

Como os demais livros publicados pela Cold Spring Harbor Laboratory, estes dois compõem o Vol. 9 da série dedicada aos vários tópicos do controle da diferenciação, crescimento e funções de células normais e tumorais ou infectadas por vírus, reunem as conferências feitas por mais de uma centena de investigadores, criteriosamente selecionados de acordo com a importância de suas contribuições neste campo da biologia celular. Inicia-se o livro com um tributo prestado a Jacob Furth (1896 - 1979). Salientam-se suas importantes contribuições para o conhecimento das leucoses

aviárias e das leucemias murinas com a demonstração da natureza "acelular" do(s) agente(s) transmissor(es) das primeiras e da importância de determinados hormônios na diferenciação celular e na oncogênese. Ressalte-se que, em decorrência de tais estudos a experimentação animal ganhou as linhagens isogênicas de camundongos AKR, RF e de ratos W/Fu. Suas contribuições, distribuídas em mais de 300 publicações, foram feitas ao longo de mais de meio século de vida dedicada à pesquisa e ao ensino.

Seguem-se os relatos de observações antigas e recentes sobre os efeitos de hormônios, particularmente estrógenos e andrógenos na tumorogênese de certas células, sobre os efeitos induktores de embriogênese e sobre o crescimento e desenvolvimento de células normais e tumorais. Tais efeitos são analisados também em relação a células associadas com lesão tecidual. Neste particular, além dos efeitos produzidos por hormônios bem definidos como insulina e glucagon descrevem-se os fatores induktores de crescimento - growth factors (GF) encontrados em tecidos ou "induzidos" durante cultura de células em meios definidos. Entre estes últimos, destacam-se o EGF (epidermal growth factor) descrito por Richman & col. em 1976, ao qual se credita papel importante na formação e manutenção de numerosas estruturas de origem epitelial; o NGF (nerve growth factor) promotor da atividade de síntese de certos neurônios sensoriais; o PDGF (platelet derived growth factor), o MDGF (monocyte/macrophage derived growth factor) e o EDGF (endothelium growth factor) os quais são levados e liberados nas lesões teciduais. Seguem-se cinco comunicações que tratam dos progressos alcançados na optimização de meios para suportar o crescimento celular. O controle do crescimento celular é, subsequentemente analisado em função dos meios de suporte para as células nas culturas, dos fatores induktores de migração, da adesão e do espraiamento celular. Entre os primeiros, o fator de crescimento derivado de plaquetas foi analisado mais minuciosamente não só com respeito a sua estrutura mas também com relação ao seu modo de ação como fator quimiotático e mitogênico, para vários tipos celulares tais como fibroblastos, células musculares lisas e células neurogliais. Entre os segundos, destaque especial é dado às fibronectinas celular e palasmática e sobre a influência destas glicoproteínas na adesão, diferenciação embrionária e crescimento celular.

No livro B estão apresentadas, de forma sistemática, as técnicas de cultura dos vários tipos celulares normais ou cancerosos. Inicia-se o livro com 3 artigos sobre os métodos de obtenção e cultura de células isoladas de tumores do pulmão destinadas a estudos que visam o esclarecimento das alterações genéticas por que passam tais células e as alterações bioquímicas e antigênicas subsequentes. O diagnóstico rápido e precoce do tipo de tumor para a terapêutica adequada constitui-se na principal finalidade de tais estudos. Esta seção termina com o relato de estudos interessantes sobre os efeitos do ácido retinoico suprimindo o crescimento e a diferenciação de células obtidas do carcinoma epidérmico broncogênico tanto quando cultivadas "in vitro" como transplantadas para camundongos "nude".

Seguem-se 6 comunicações sobre cultura de células linfóides. A primeira comunicação trata do estabelecimento das condições básicas para a cultura de células precursoras de linfócitos, bioquimicamente caracterizadas pela presença da enzima deoxyribonucleotidil transferase, as quais permitirão as análises dos fatores celulares e hormonais que regulam a linfopoiese, possivelmente, a leucogênese.

A segunda comunicação relata o desenvolvimento de meio simples para o crescimento de linfócitos humanos normais obtidos do sangue circulante, no qual soro ou albumina foram satisfatoriamente substituídos por etanolamina, trasnferrina, insulina e selenium (ETIS) adicionados ao meio de Dulbecco - MFM. As demais comunicações desta seção relatam o papel de lipídios constituídos por ácidos graxos saturados e insaturados e de fosfolipídios na manutenção do crescimento de células linfóides.

Na Seção 11, descrevem-se os experimentos de crescimento de células da glândula mamária "in vitro". Estuda-se o papel dos fosfolipídios, dos hormônios prolactina e de estrógenos nos controles endócrino, parácrino e autócrino destas células. Relata-se, a seguir, a purificação parcial do MGF de útero de carneiro. Esta seção culmina com o relato de resultados sobre os efeitos moduladores dos hormônios mamogênicos nos tecidos da glândula mamária e sobre a expressão seletiva dos genes responsáveis pela síntese de caseína.

Segue-se uma série de comunicações sobre cultura de mioblastos, células de melanoma, células do carcinoma epidermóide e de teratoma derivado de células fibroadipogénicas.

O crescimento de células neurogliais e neuronias e de células originadas do tracto reprodutor é descrito nas duas últimas seções deste livro. Em todas estas comunicações encontram-se as descrições dos meios desenvolvidos ou em desenvolvimento e dos fatores nutricionais e hormonais moduladores do crescimento de tais células.

Todas as comunicações são apresentadas na forma tradicionalmente usada para a publicação de trabalhos, isto é, com introdução, materiais e métodos, resultados e discussão.

Tabelas, gráficos, histogramas, fotomicrografias, etc., são da melhor qualidade, terminando com primorosas listas de referências bibliográficas.

Enfim, trata-se de obra indispensável para todos aqueles envolvidos direta ou indiretamente com os problemas de cultura de células.

Thereza L. Kipnis
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
01000 São Paulo SP

Heath, I.B., ed. - Nuclear division in the fungi. New York, Academic Press, 235p., 1978. US\$ 21.50.

O núcleo das células dos fungos tem estimulado especulações por numerosos autores, nos últimos 80 anos, em morfologia e evolução. Revisões amplas surgiram nos anos de 1926, 1953, 1965 e 1975. O livro lançado pela Academic Press resultou de textos expandidos de apresentações durante simpósio sobre mitose em fungos, no II Congresso Micológico Internacional, em Tampa, Flórida, em 1977.

Os objetivos do simpósio estão justificados pelos quatro capítulos do livro: Introdução e revisão histórica (Manfred Girbardt); Movimentos cromossómicos durante a divisão celular: possível envolvimento de filamentos de actina (Arthur Forer); Estudos experimentais de mitose nos fungos (I. Brent Heath) e Mitose e filogenia fúngica (Donna F. Kubai). De fato, há atualização do conhecimento e das hipóteses, sobre a cariologia dos seres vivos, em especial dos fungos e analisadas as implicações da mitose fúngica, do ponto de vista filogenético.

O fato de dois autores não serem micologistas já serve para valorizar a leitura do texto, uma vez que o tratamento a bases comparativas, com benefício a micologistas e especialistas em outros tipos de organismos. Aliás, é importante destacar que os estudos sobre o núcleo de fungos tem ficado praticamente restrito ao reinado dos micologistas. Não seria surpresa, no Brasil, que o conhecimento abordado no livro seria praticamente ignorado por muitos citologistas e geneticistas que lidam com animais, vegetais e, possivelmente, com outros microrganismos.

De modo geral, a citologia fúngica é desafio à capacidade inventiva do pesquisador acostumado às figuras mitóticas (e meióticas) tradicionalmente encontradas nos modelos experimentais eucarióticos. Além disso, também constituem desafio aos limites de resolução de métodos de tratamento, evidenciação e observação. Por isso, a mitose fúngica ainda está aberta ao debate se se trata de variante do esquema fundamental ou se é marco evolutivo na eumitose.

As interrogações a serem esclarecidas, na divisão nuclear nos fungos devem ser associadas às interrogações ainda existentes quanto à própria homogeneidade biológica que os fungos representariam. Consequentemente, a complexidade de que trata o texto deverá ser analisada em relação à própria complexidade que os fungos representam como grupo heterogêneo de seres vivos. Quando isto for levado na devida conta, o aproveitamento do texto será mais amplo, enriquecido pelas provocações, ao leitor, feitas pelos autores.

Girbardt sugere novas abordagens técnicas, para o exame da cromatina, complexo sinaptonêmico, substância nucleolar, nucleolo, envelope nuclear e um conjunto de estruturas associadas à formação do aparelho mitótico e movimentação cromossómica.

Sob as denominações de NAO - "nucleus associated organelle", SPB - "spindle polar bodies", MTOC - "microtubule organizing center", entre outras, é discutida a formação do fuso, a ocorrência de centriolos e centriolo-equivalentes. As provocações de Girbardt são fonte de inspiração para inúmeros projetos de pesquisa científica.

O movimento cromossômico e sua relação aos filamentos de actina é assunto tratado por A. Forer, com propriedade e detalhamento que abrange a migração cromossônica e as características físico-químicas das fibras do fuso nuclear. A análise abrange aspectos ligados aos microtúbulos, tubulina e miosina. Como os microtúbulos e a tubulina, combinados apenas formam porção minoritária do fuso e a maior parte do sistema ainda é desconhecida, torna a migração polar dos cromossomos um assunto intrigante.

Brent Heath examina as diferentes figuras mitóticas, reveladas pelos estudos de fungos e organismo afins (afins ?), em relação à segregação dos genomas. O capítulo amplia a visão do leitor sobre os componentes nucleares, especialmente em relação ao centriolo, SBP, MTOC, placas, anéis, discos, glóbulos, barras, cinetocoro-equivalente, todos elementos genericamente agrupados sob o título de NAO. Embora abordando aspectos tratados nos capítulos anteriores, particularmente em relação ao texto de Forer, Brent Heath enriquece a compreensão do assunto, por trazer numerosas contribuições especificamente feitas por investigações em fungos. Interesse especial deverá ser provocado pelas discussões sobre as substâncias antimítóticas e as técnicas utilizadas em estudos experimentais da mitose fúngica.

O último capítulo, por D.F. Kubai parte da hipótese de que os estudos comparativos da mitose podem levar à visão filogenética, tanto entre os fungos, como em relação a ancestrais mais distantes. São extrapoladas evidências fósseis e examinada a transição procarioto-eucarioto, na gradual passagem de movimentos cromossômicos membrana-mediados para microtúbulos-mediados. Ganham destaque o fuso nuclear e as estruturas associadas ao comportamento mitótico. O autor discorda das relações filogenéticas entre fungos e protistas, com base nas similaridades da mitose. Para ele, trata-se de semelhança causada por evolução convergente e que o desafio imposto pela completa compreensão da origem das similaridades, em cada grupo, permitirá a dupla vantagem de entender-se melhor, as bases filogenéticas nos dois grupos: fungos e protistas.

Os interessados em biologia de fungos deverão considerar o livro uma aquisição obrigatória. Os que se dedicam ao estudo do comportamento nuclear em quaisquer outros tipos de organismos, encontrarão, nos textos, informações indispensáveis à expansão de seu entendimento pessoal. Pelas implicações e provocações levantadas, a leitura não deveria escapar de todo e qualquer micologista.

Graficamente, o livro é de excelente qualidade em reprodução de foto e eletromicrografias. Apesar do excelente papel cuchê utilizado, a composição gráfica poderá "escandalizar" alguns editores mais puristas, que estão presos aos processos tradicionais (embora facilitados por equipamentos de fotocomposição). O texto foi reproduzido diretamente de originais datilografados, sem preocupações com margens, e outros detalhes visuais, tipos gráficos itálico, versal, negrito, etc. Os nomes de gêneros e espécies foram simplesmente grifados, para indicar sua distinção da língua inglesa.

Toda a simplificação serviu para produzir rápida e preços mais baixos, o que não desmerece, em absoluto, a qualidade e oportunidade da obra. Talvez sirva de estímulo a organizações menos dotadas de prestígio e recursos econômicos do que a Academic Press, particularmente nos países menos desenvolvidos, como alternativa para a difícil sustentação de custos e prazos, na difícil arte de publicar.

João Salvador Furtado
Presidente da SBM
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Divisão Nacional de Epidemiologia - Estatística de mortalidade: Brasil, 1979. Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, 386p., 1982.

A obtenção sistemática e regular de dados sobre a mortalidade constitui uma das mais importantes tarefas da epidemiologia, quer em sua própria prática, quer como subsídio para o desenvolvimento de atividades científicas correlatas. Dada a relevância do assunto, o Ministério da Saúde, a partir de meados da década passada, adotou uma série de providências no sentido de obter maior fidedignidade e abrangência das informações coletadas. Entre tais medidas, destacou-se a implantação da chamada "declaração de óbito", substituindo os diferentes formulários e modelos de atestados que vinham sendo utilizados. Adicionalmente, foi criado o Centro Brasileiro de Classificação das Doenças, dotado dos recursos mais avançados para computação e análise de dados.

Apesar de todas as exigências legais, que extrapolam o campo da saúde, o sistema acredita alcançar somente cerca de 70% dos óbitos efetivamente ocorridos, não apenas em função do sub-registro, como também em consequência dos chamados "óbitos sem assistência médica". O documento em análise descreve, com centenas de tabelas, os óbitos referentes ao ano de 1979, distribuídos mediante vários cruzamentos, segundo as variáveis: causa, sexo, idade, estado e município (este só o das capitais). Como ilustração, pode ser dito que para o país como um todo, do total estimado de 1 milhão de óbitos, 711.742 foram colhidos pelo sistema. As doenças do aparelho circulatório representaram 178.567 casos, sendo hoje a principal causa de mortalidade em nosso meio, seguindo-se as doenças infecciosas e parasitárias. Neste grupo, avultam as doenças infecciosas intestinais mal-defendidas. Cumpre assinalar que a mortalidade de menores de 1 ano de idade totalizou 181.400 registros, ou seja, pouco mais de 25%.

O trabalho ora divulgado como fruto do importante programa implantado pelo Ministério da Saúde demonstra cabalmente que o perfil detalhado da estrutura da mortalidade de determinada população permanece ainda como a mais usual fonte de obtenção de estatísticas para a construção de indicadores de saúde, devendo ser, portanto, amplamente utilizado para fins de planejamento e administração de serviços e programas de saúde.

Antonio Augusto F. Quadra
& Italo Svassuna
Faculdade de Ciências Médicas UERJ
Rua Manoel de Abreu, 48
20551 Rio de Janeiro RJ

Slonimski, P.; Borst, P. & Attardi, G. - Mitochondrial genes. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 500p., 1982.

Dedicado a Boris Ephrussi, que há cerca de 30 anos ao descobrir a mutação "petite colonie" na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, inaugurou um novo campo da genética, o da genética mitocondrial, o livro consiste dos "proceedings" de um simpósio sobre genética mitocondrial, realizado em maio de 1981, nos laboratórios da Cold Spring Harbor, N.Y., EUA.

O livro reune 47 artigos, que cobrem os aspectos mais modernos da genética mitocondrial, quais sejam, as particularidades recentemente descobertas que o DNA mitocondrial apresenta quanto ao código genético e à replicação, a organização e a expressão dos genes codificados pela mitocôndria e a interação entre a informação genética do núcleo e das mitocôndrias para a biogênese das mitocôndrias. Hoje já se conhecem 200 grupos de complementação a nível nuclear que afetam o comportamento mitocondrial. De muito interesse também, é a área que começo a se desenvolver do estudo comparativo de sequências de DNA mitocondrial de diferentes origens, permitindo que seja feita a análise da evolução do genoma mitocondrial diretamente a nível molecular. Ficam já evidentes diferenças básicas entre a organização do genoma mitocondrial de animais, em que os genes são contíguos e não interrompidos, e a do genoma de fungos, dos quais a levedura forneceu um dos primeiros exemplos de genes

interrompidos, comportando exons e introns. O estudo dos introns do DNA mitocondrial deste eucarioto inferior, quanto à sua função, expressão e regulação, encontra-se consequentemente relativamente adiantado, havendo no livro 5 artigos sobre este assunto. Vai ficando cada vez mais clara a noção de que os introns não são isentos de informação genética, uma vez que já se demonstrou que alguns dos introns da levedura codificam para mRNA maturases, envolvidas no processamento ("splicing") do transcrito primário para dar origem ao mRNA maduro, no qual todos os exons estão fundidos e do qual todos os introns foram removidos e que será traduzido na proteína funcional. Outra diferença notável entre os sistemas mitocondriais de animais e fungos é a presença de vários pontos de iniciação da transcrição na levedura, em contraste com o que se observa no caso do DNA mitocondrial de mamíferos. De relevância é a descoberta de mutantes mitocondriais de resistência ao cloranfenicol e à eritromicina em células humanas, o que irá sem dúvida permitir um avanço ainda maior no conhecimento da genética mitocondrial humana. Por outro lado, começam também a se desenvolver os conhecimentos sobre a genética mitocondrial de fungos filamentosos, protozoários e plantas, deixando entrever várias peculiaridades de cada sistema.

Sérgio Olavo Pinto da Costa
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Roberts, D.W. & Castillo, J.M., eds. - Bibliography on pathogens of medically important arthropods. Bull. Wld. Hlth. Org., Supplement, 58:1-197, 1980.

Fazer comentário crítico sobre uma publicação como a acima citada é uma tarefa simples porque o trabalho é tão bem ordenado que basta a observação do índice para orientar perfeitamente o leitor.

A Organização Mundial de Saúde já fizera duas compilações da literatura sobre agentes patogênicos que atuam sobre artrópodos de importância médica. A primeira, editada em 1964 e a segunda, em 1977, ambas como suplementos aos volumes 30 e 55, respectivamente, do "Bulletin of the World Health Organization". A presente edição é a terceira, publicada como suplemento ao vol. 58, 1980 do "Bulletin" e editada por Roberts & Castillo, do Boyce Thompson Institute, Cornell University, Ithaca, N.Y., EUA.

As referências bibliográficas, acompanhadas de boas tabelas, resumos e comentários, dão idéia do conteúdo, orientando o consultente. Elas estão agrupadas de acordo com os agentes infeciosos e parasitários patogênicos para artrópodos. É uma publicação indispensável nos laboratórios que se dedicam ao estudo de artrópodos de interesse médico.

A pesquisa bibliográfica procura cobrir a literatura a partir da última listagem (1977) mas fazendo referência, também, a alguns trabalhos anteriores.

Para os leitores brasileiros é estimulante verificar que logo o primeiro trabalho resumido é sobre uma pesquisa efetuada por cientistas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), em Aripuanã, na ex-cidade científica de Humboldt, sobre microsporídeos possivelmente patogênicos para flebótomos. Mais 150 páginas e a segunda e última referência a trabalho efetuado no Brasil: a susceptibilidade do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, um dos bons transmissores da doença de Chagas, ao fungo *Metarrhizium anisopliae*, em experiências de laboratório feitas na Bahia.

Esses dois únicos trabalhos evidenciam que existem alguns grupos ativos no assunto, no Brasil. Entretanto, não deixa de ser melancólico verificar que são apenas dois, entre centenas de outros estrangeiros, o que revela o crescente interesse a respeito dos inseticidas biológicos ou de terceira linha. Trata-se de um ramo da Microbiologia que merece estímulo. Maior número de pesquisadores, por exemplo, alunos de Mestrado e Doutorado em microbiologia, poderia ser encaminhado para o assunto, a semelhança do que está sendo feito na Universidade de Brasília, no laboratório do Prof. João Lúcio de Azevedo, com o citado fungo *Metarrhizium anisopliae*, con-

siderado bom controlador de importante praga de pastagens, a cigarrinha.

Milton Thiago de Melo
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade de Brasília
70910 Brasília DF

UNESP/Instituto de Biociências/Deptº de Bioquímica - Vinte anos de atividades, 1962-1982. Rio Claro, 47p., 1982.

Este "memorial", mesmo sem contar com a sofisticação gráfica comum a seus congêneres americanos e europeus, retrata minuciosa e objetivamente o trabalho no Departamento de Bioquímica do Instituto de Biociências no Campus de Rio Claro da Universidade Estadual "Julio de Mesquita Filho".

Todas as atividades do departamento são suscintamente abordadas, desde a constituição e qualificação do corpo docente chefiado pelo Prof. Dr. Alcides Serzedello, até os trabalhos publicados nos últimos vinte anos, passando pelas linhas de pesquisa em andamento e disciplinas afetas ao departamento.

A simples leitura do documento apenas não deixa transparecer a vontade, dedicação e disciplina, com que são encarados os trabalhos, tanto a nível de ensino como de pesquisa, naquele departamento, apesar da falta de recursos com que pode contar.

Leonardo Perego Junior
Av. São Gabriel, 18
01435 São Paulo SP

Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde - Praguicidas em saúde pública: manual. Brasília, Comissão Permanente de Inseticidas e Raticidas, da Câmara Técnica de Saneantes Domissanitários, Centro de Documentação/Ministério da Saúde, Série A: Normas e Manuais Técnicos, 2, 160p., 1982.

Bastante louvável a publicação do Manual "Praquicidas em Saúde Pública", elaborado pelo grupo de trabalho, designado pelo Presidente da Comissão Permanente de Inseticidas e Raticidas, da Câmara Técnica de Saneamentos Domissanitários, do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde - publicado pelo Centro de Documentação do Ministério da Saúde, Esplanada dos Ministérios, Bloco G - Térreo, 70058 Brasília DF, 1982.

Constando de dez capítulos, fornece a lista de produtos aplicáveis à saúde pública, com ação: 1. inseticida; 2. sinergista; 3. desalojante; 4. moluscicida; 5. raticida e vampiricida.

O capítulo 3 fornece a lista de produtos nas formulações recomendadas e as restrições de uso, divulgando informações bastante necessárias em relação ao tipo de formulação e dosagem a serem aplicadas.

Os capítulos seguintes informam, entre outros itens, sobre rotulagem e instruções de transporte e uso. O controle médico do pessoal engajado em campanhas e o tratamento das intoxicações, antídotos e casos de emergência; os cuidados na aplicação terrestre e por via aérea, também são temas abordados.

Seguem-se as especificações dos praguicidas e métodos analíticos das preparações, baseados nas publicações da OMS.

Com a falta de informação habitual sobre o trabalho desenvolvido pelos órgãos governamentais, cuja publicação em diário oficial é de difícil acesso e fragmentada, a edição do presente manual representa facilidade aos interessados no assunto, embora seja necessário alertar para a necessidade de constante atualização do mesmo, pois todo processo é dinâmico.

Walkyria Lara
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
Caixa Postal 7027
01000 São Paulo SP

Impresso em offset



Avenida Bogart, 64
Vila das Mercês São Paulo
Fone: 914-0233
CEP: 04236

com fôrmas fornecidas pelo editor