

Revista de Microbiologia

Regina



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 14 Número 4 Out.-Dez. 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). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos 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 (μl litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (8^a ed., 1974) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

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

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

A página título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação. O resumo não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÉNCIAS 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 — Deverão ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicularmente e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explicativas 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 retículas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTA BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. Os 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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cid. Universitária - USP
01000 - São Paulo/SP

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Conselho Diretor Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Diretor Executivo João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Diretor Associado 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.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

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

Objetivos A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar 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.

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

Rhodia S.A.

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
 PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
 VOLUME 14 OUTUBRO-DEZEMBRO 1983 NÚMERO 4
 REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 14(4)

	CONTEÚDO	CONTENTS
Maria Cristina D. Vanetti Daison O. Silva & Arnaldo C. Borges	233 Crescimento de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> em vinhaça suplementada ou não com ureia e fosfato de sódio	<i>Growth of Bacillus in distillery slops with urea and sodium phosphate supplementation</i>
Evanil P. Campos Oswaldo G. Brasil & Cláudia E.O.P. Campos	239 Ação de antimicrobianos sobre o componente respiratório de bactérias	<i>Effect of antimicrobial agents on the respiratory component of bacteria</i>
Renate Schoebitz & L. Montes	247 Viabilidad de diferentes cepas bacterianas en cuatro diluyentes de uso frecuente	<i>Viability of different bacterial strains in four commonly used diluents</i>
Maria de Lourdes M. da Silva Marília A. Yamamoto & Norma P.F. Severo	254 Resistência a drogas, lisogenia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas	<i>Drug resistance, lisogeny and production of colicin and hemolysin among enteropathogenic Escherichia coli strains</i>
Vanete Thomaz Glaci T. Zancan & Shigehiro Funayama	259 Regulação dos níveis de desidrogenase lática em <i>Dactylium dendroides</i>	<i>Regulation of L-lactate levels in Dactylium dendroides</i>
Clara P. Mendonça Carlos Solé-Vernin & Maurício A. Nogueira	265 Ocorrência de Estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A (e seus tipos T); C e G em escolares de Araraquara SP, setembro de 1979	<i>The occurrence of groups A (and its T types) C and G of beta-hemolytic streptococci in school children in Araraquara SP, Brazil, September 1979</i>
Heriberto Fernández & Laura Otth	273 Sensibilidade in vitro de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> a seis drogas antimicrobianas	<i>In vitro susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to six antimicrobial drugs</i>
Maria I. Sato Petra S. Sanchez & Maria Therezinha Martins	276 Isolamento de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica em água e esgoto de São Paulo, Brasil	<i>Isolation of enterotoxigenic Escherichia coli in water and sewage in São Paulo, Brazil</i>

Marina B. Martinez Roberto A.A. Moura Elsa M. Mamizuka Maria de Fátima B. Pavan & Laércio R. Porto Jr.	282	Flora anaeróbia vaginal de mulheres sem infecção genital aparente	<i>Anaerobic bacteria from the vagina of women without apparent gynecological infection</i>
Ernani S. Sant'Anna & Eugênio Aquarone	285	Licor sulfítico (licor negro) como substrato para o crescimento de <i>Candida utilis</i> : estudo experimental	<i>Sulphite liquor as a medium for the growth of <i>Candida utilis</i></i>
Nilma C. Leal Ernesto Hofer Marinalva F. Costa & Agenor T. de Sá	290	Isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> de líquido cefalorraquidiano, em Recife, Pernambuco	<i>Isolation of <i>Listeria monocytogenes</i> from cerebrospinal fluid, in Recife city, Brazil</i>
Informação Técnico-Científica SBM	292		

CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* EM VINHAÇA SUPLEMENTADA OU NÃO COM URÉIA E FOSFATO DE SÓDIO

Maria Cristina Dantas Vanetti
 Daison Olzany Silva
 & Arnaldo Chaer Borges

Laboratório de Microbiologia
 Deptº de Biologia Geral
 Universidade Federal de Viçosa
 36570 Viçosa MG, Brasil

Resumo

Foi estudado o comportamento de quatro culturas bacterianas do gênero *Bacillus* em meios de vinhaça de mosto de melaço de cana-de-açúcar esterilizada e com pH ajustado para 6,5-7,0. Observou-se que a suplementação com 1% de ureia não alterou a taxa de crescimento das bactérias. A adição de 2% de fosfato de sódio na vinhaça provocou uma redução na fase de adaptação e na taxa de crescimento das bactérias em estudo. Pela análise da atividade de fosfatases verificou-se a existência de fosfatases repressíveis. Estas enzimas podem ser responsáveis pela maior taxa de crescimento observada em meios de vinhaça sem o fosfato de sódio.

Summary

Growth of Bacillus in distillery slops with urea and sodium phosphate supplementation

The growth of four bacterial cultures of the genus *Bacillus* was observed in sterilized distillery slops of sugar cane molasses with the pH adjusted to 6,5 - 7,0. It was observed that the bacterial growth rate wasn't altered in vinasse with 1% urea supplementation. With 2% sodium phosphate supplementation, the reduction of adaptation phase and growth rate of all bacterial cultures studied was observed. Through the analysis of phosphatases activity, the existence of repressed phosphatases is reported. This enzymes can be responsible for the higher growth rate observed under conditions of phosphate starvation in vinasse.

Introdução

Os resíduos industriais e agrícolas, que muitas vezes constituem sérios problemas ambientais, são exemplos de substratos utilizáveis pelos microrganismos para a produção de biomassa. A vinhaça, também conhecida como vinhoto, calda ou restilo é um resíduo que, por sua composição química, apresenta-se como um substrato promissor para a produção de massa celular.

Um grande número de leveduras e outros fungos, além de algas, tem sido estudado visando a produção de proteína de unicelulares em vinhaça (11). A utilização de bactérias como fonte de proteína é uma alternativa promissora, e entre algumas van-

tagens apresentadas pelas bactérias sobre outros microrganismos, citam-se o menor tempo de geração, o alto conteúdo protéico e, principalmente, a qualidade das proteínas que geralmente apresentam maiores teores em aminoácidos essenciais. Mas, muitas restrições são feitas ao uso de bactérias como fonte protéica, entre elas, a falta de informação sobre a patogenicidade, o elevado conteúdo em ácidos nucleicos e dificuldades na recuperação das células (3,5).

Bactérias do gênero *Bacillus* já foram estudadas para a produção de biomassa nos mais diversos substratos (8, 10, 16) e já foi verificado que a incorporação de célula de *B. megaterium* na concentração de até 20% da ração de ratos não apresenta nenhum efeito tóxico (14).

Este trabalho constitui um estudo sobre o comportamento de quatro culturas bacterianas do gênero *Bacillus* em meios de vinhaça de mosto de melaço de cana-de-açúcar, suplementada ou não com uréia e fosfato de sódio.

Material e Métodos

Microrganismos - Foram utilizadas quatro culturas de bactérias do gênero *Bacillus* (V_1 , V_2 , V_3 e V_4) isoladas de vinhaça represada (17) e mantidas no Laboratório de Microbiologia/UFV em ágar nutritivo a 4°C.

Análise de vinhaça - Açúcares redutores e totais foram analisados pelos métodos de Somogyi (13) e antrona (15) respectivamente. Os teores em sólidos totais, nitrogênio, proteína bruta e cinzas foram determinadas segundo o AOAC (1). A análise de fósforo seguiu técnica descrita por Luek & Boltz (7) e o pH medido em pH-metro Miconal.

Cultivo em vinhaça - Como substrato para o crescimento bacteriano foi utilizada a vinhaça de mosto de melaço de cana-de-açúcar, coletada à saída das colunas de destilação. Utilizaram-se Erlenmeyers de 250ml com 60ml de vinhaça com pH corrigido para 6,5 - 7,0 com NaOH 5N, adicionados de 9,1% de Tween 80 (polioxietilenosorbitano monoestearato), pérolas de vidro de 5mm de diâmetro para evitar aglomerados de células durante o crescimento e tratados pelo calor a 121°C por 15 minutos. Foi verificado o comportamento das bactérias em vinhaça suplementada com 1% de uréia e/ou 2% de fosfato de sódio, esterilizados, respectivamente, em membrana Millipore com 0,22 μ m de diâmetro e em autoclave, à 121°C por 15 minutos. Como inóculo foi utilizado 0,1ml da suspensão de células preparadas a partir de culturas de 12 horas em 100ml de meio mínimo (K_2HPO_4 , 7g; K_2HPO_4 , 2g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 10%, 1ml; $(NH_4)_2SO_4$, 1g e água destilada, 1 litro) suplementado com 0,02% de extrato de levedura e 0,02M de glucose, centrifugadas a 2.000 xg por 10 minutos, lavadas em solução salina (NaCl 0,8% esteril) e ressuspensas em 1ml de solução salina. Os frascos Erlenmeyers foram mantidos imersos em banho maria a temperatura constante e agitados continuamente em agitador recíproco de braços Burrel, mod. BB. A temperatura de incubação foi de 45°C para o isolado V_1 e V_4 , 40°C para o isolado V_3 e 35°C para o isolado V_2 (17). Foram retiradas amostras por um período de 12 horas para contagem de células pelo método de contagem em placas. Foi utilizada técnica de gotas de 10 μ l (6) e os pontos para traçar as curvas de crescimento foram obtidos da média de 5 repetições.

Taxa específica de crescimento - Os valores de tempo de geração foram determinados graficamente e a taxa específica de crescimento foi calculada segundo Sokatech (12).

Atividade de fosfatases - A atividade de fosfatases foi determinada pelo método descrito por Bergmeyer (2) e a atividade enzimática foi medida em espectrofotômetro Bausch & Lomb, mod. Spectronic 20, a 410nm. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima que cataliza a liberação de 1 μ mol de p-nitrofenol por 1ml e por hora.

Resultados

A Tabela 1 mostra os resultados das análises da vinhaça utilizada neste estudo.

Foi observado que em meios de vinhaça não suplementados com fosfato de sódio, o crescimento bacteriano iniciou-se após um período de 2 a 3 horas de incubação durante o qual ocorreram reduções no número de células iniciais (Figs. 1, 2, 3, 4). A adição de 2% de fosfato de sódio permitiu que o crescimento se iniciasse nas primeiras horas de incubação mas afetou negativamente a taxa específica de crescimento de todas as quatro culturas (Tabela 2). A adição de 1% de uréia à vinhaça não afetou o crescimento das bactérias, uma vez que as taxas específicas de crescimento não sofreram alterações apreciáveis em relação à vinhaça sem uréia (Tabela 2).

Os resultados das análises de fosfatases em meios de vinhaça com ou sem a adição de fonte de fósforo (Figs. 5, 6, 7, 8) mostraram que o fosfato inorgânico adicionado ao meio reprime a síntese de fosfatases, pois em vinhaça não suplementada com fosfato inorgânico foi verificado sempre maiores níveis de fosfatases com atividades máximas no início da fase estacionária de crescimento.

Discussão

Foi observado que a uréia não constitui uma boa fonte de nitrogênio para as bactérias em estudo. Tsuchida & col. (16), estudando o efeito de diferentes fontes de nitrogênio para o crescimento e produção de proteína em *B. brevis* verificaram, também, que a adição de 1% de uréia a meio sintético apresentava efeito insignificante quando comparada com sais de amônio.

A demora em iniciar o crescimento observado quando as culturas foram inóculadas em meios de vinhaça não suplementada com fosfato de sódio pode ser justificado considerando que o inóculo foi crescido em meio contendo fosfato inorgânico (meio mínimo) e, portanto, sem a necessidade de síntese de fosfatases. Quando transferidas para a vinhaça, as células apresentaram uma fase "lag" correspondente ao tempo de indução da síntese das fosfatases necessárias para a utilização de fosfatos orgânicos existentes no meio. Em estudos de síntese de fosfatase alcalina por células de *Mycobacterium smegmatis*, observou-se que a síntese da enzima iniciava-se após uma fase "lag" de 50 minutos (4).

A redução das taxas específicas de crescimento quando se adiciona fosfato inorgânico à vinhaça pode, também, envolver fosfatases. A hipótese é de que os fosfatos inorgânicos, além de reprimirem a síntese destas enzimas, retardam a desfosforilação de compostos orgânicos que seriam utilizados como fonte de carbono.

Tabela 1 - Resultados da análise da vinhaça de mosto de melão

Componentes	g/100ml
Sólidos totais	4,40
Ácidos redutores	0,33
Carbohidratos totais	0,76
Nitrogênio (Kjeldahl)	0,03
Proteína bruta (% N x 6,25)	0,19
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,04
Cinzas	1,26
pH	4,0

Tabela 2 - Taxas específicas de crescimento (K_h^{-1}) das culturas de *Bacillus* em vinhaça suplementada ou não com 1% de uréia e/ou 2% de fosfato de sódio.

Símbolos: * = Dados médios de 3 determinações

	Meios de vinhaça				
	Iso- lado sem adição uréia	1% ureia de sódio	2% fosfato de sódio	1% ureia + 2% fosfato de sódio	$K_h^{-1}*$
V ₁	1,03	1,18	0,69	0,71	
V ₂	0,45	0,65	0,23	0,22	
V ₃	0,70	0,69	0,64	0,68	
V ₄	1,21	1,46	0,75	0,46	

Figura 1 - Crescimento do isolado V₁ em meios de vinhaça com ou sem suplementação de 1% de uréia e/ou 2% de fosfato de sódio. Incubação a 45°C. Dados médios de 3 repetições

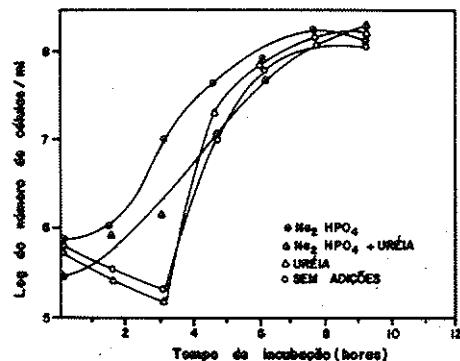


Figura 2 - Crescimento do isolado V_2 em meios de vinhaça com ou sem suplementação de 1% de uréia e/ou 2% de fosfato de sódio. Incubação a 35°C. Dados médios de 3 repetições

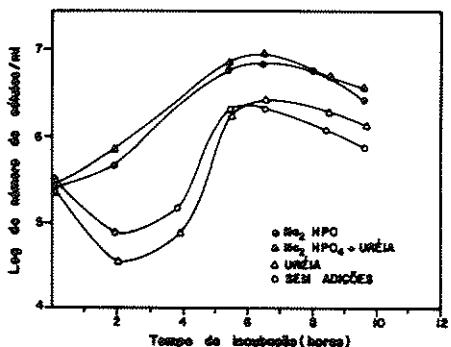


Figura 3 - Crescimento do isolado V_3 em meios de vinhaça com ou sem suplementação de 1% de uréia e/ou 2% de fosfato de sódio. Incubação a 40°C. Dados médios de 3 repetições

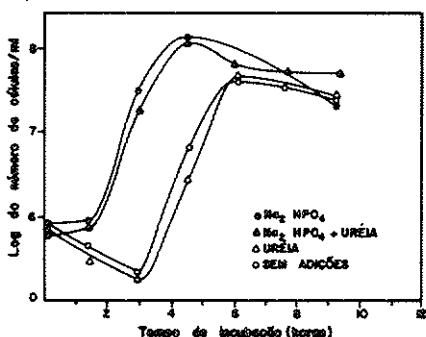


Figura 4 - Crescimento do isolado V_4 em meios de vinhaça com ou sem suplementação de 1% de uréia e/ou 2% de fosfato de sódio. Incubação a 45°C. Dados médios de 3 repetições

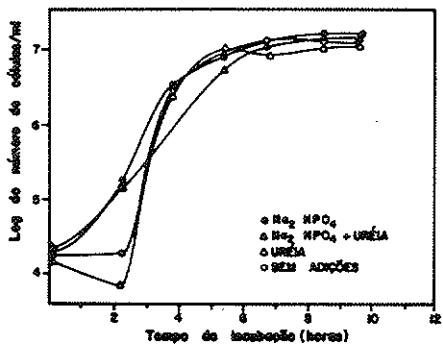
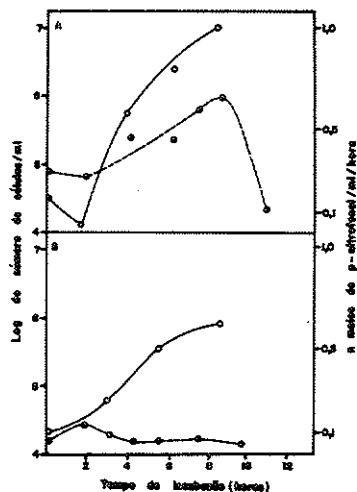


Figura 5 - Efeito da adição de fósforo inorgânico na atividade fosfatases (-o--) e no crescimento do isolado V_1 (—o—) em vinhaça. Dados médios de 3 repetições. (A) sem adição (B) adição de 2% de fosfato de sódio



A constatação da atividade fosfatase sob condições de repressão da síntese sugere a existência de mais de uma forma da enzima. Nesmeyanova & col. (9) constataram a existência de somente uma forma isomérica de fosfatase alcalina em condições de repressão da síntese da enzima e isolaram múltiplas formas desta enzima sintetizadas sob condições de derepressão, em células de *E. coli*. Os mesmos autores sugerem que a enzima sintetizada sob condições de repressão, em presença de fosfatos inorgânicos é constitutiva, uma vez que é sintetizada também em ausência de fósforo inorgânico. Assim, a atividade de fosfatases observadas nas Figuras 5B, 6B, 7B e 8B sugere tratar-se de pelo menos, uma enzima constitutiva, sem excluir a possibilidade da existência de outras formas da enzima.

A observação do comportamento das bactérias nos meios de vinhaça estudados, mostram que nas condições do experimento, não são necessárias as suplementações com 1% de ureia e 2% de fosfato de sódio para estimular o crescimento das bactérias isoladas, e que a presença de fosfato adicionada ao meio, pode inclusive, reduzir a taxa específica do crescimento.

Figura 6 - Efeito da adição de fósforo inorgânico na atividade fosfatases (---o---) e no crescimento do isolado V₂ (—○—) em vinhaça. Dados médios de 3 repetições. (A) sem adição (B) adição de 2% de fosfato de sódio

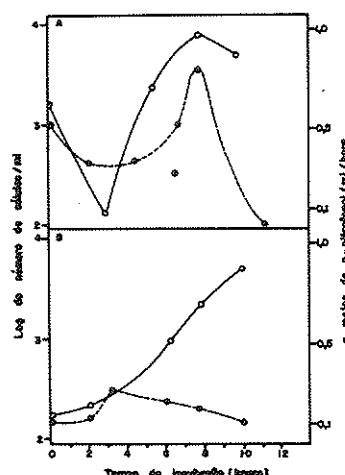


Figura 7 - Efeito da adição de fósforo inorgânico na atividade fosfatases (---o---) e no crescimento do isolado V₃ (—○—) em vinhaça. Dados médios de 3 repetições. (A) sem adição (B) adição de 2% de fosfato de sódio

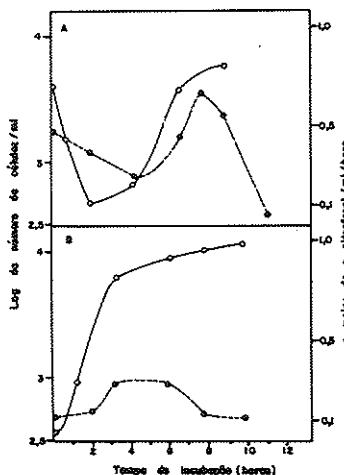
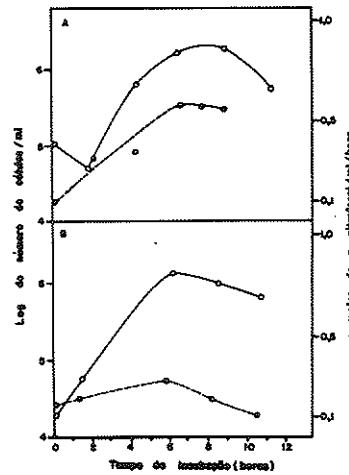


Figura 8 - Efeito da adição de fósforo inorgânico na atividade fosfatases (---o---) e no crescimento do isolado V₄ (—○—) em vinhaça. Dados médios de 3 repetições. (A) sem adição (B) adição de 2% de fosfato de sódio



Referências Bibliográficas

1. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12.ed. Washington, 1975.
2. Bergmeyer, H.U. - Methods of enzymatic analysis. 2.ed. New York, Academic Press, 1974.
3. Cooney, C.L.; Rha, C. & Tannenbaum, R. - Single cell protein: engineering, economics and utilization in foods. *Adv. Food Res.*, 26:1-53, 1980.
4. David, H.L. - Alkaline phosphatases from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Gen. Microbiol.*, 101:99-102, 1977.
5. Kilberg, R. - The microbe as a source of food. *Ann. Rev. Microbiol.*, 26:427-466, 1972.
6. Lamanna, C.; Mallette, M.F. & Zimmerman, L. - Basic bacteriology its biological and chemical background. 4.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1973.
7. Luek, C.H. & Boltz, C.F. - Spectrophotometric study of modified heteropoly blue method for phosphorus. *Anal. Chem.*, 28:1168-1171, 1956.
8. Mateles, R.L.; Baruah, J.N. & Tannenbaum, S.R. - Growth of a thermophilic bacterium on hydrocarbons: a new source of single cell protein. *Science*, 157:1322-1323, 1967.
9. Nesmeyanova, M.A.; Motlokh, O.B.; Kolot, M.N. & Kulaw, I.S. - Multiple forms of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* cells with repressed and derepressed biosynthesis of the enzyme. *J. Bacteriol.*, 146:453-459, 1981.

10. Noyes, R. - Protein food supplements. London, Noyes Development, 1969.
11. Sheehan, G.J. & Greenfield, P.F. - Utilization treatment and disposal of distillery wastewater. *Water Res.*, 14:257-277, 1980.
12. Sokateck, J.R. - Bacterial physiology and metabolism. New York, Academic Press, 1969.
13. Somogyi, M. - Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195:19-23, 1952.
14. Tannenbaum, S.R. & Miller, S.A. - Effect of cell fragmentation on nutritive value of *Bacillus megaterium* protein. *Nature*, 214:1261-1262, 1967.
15. Trevelyan, W.E. & Harrison, J.S. - Studies on yeast metabolism. I - Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.*, 50:298-302, 1952.
16. Tsuchida, T.; Miyashiro, S.; Enei, H. & Ukada, S. - Protein production in chemically defined medium by *Bacillus brevis* n° 47. *Agric. Biol. Chem.*, 44:2291-2295, 1980.
17. Vanetti, M.C.D.; Silva, D.O. & Borges, A.C. - Caracterização, teor proteico e aminoácidos essenciais de quatro culturas de *Bacillus* isoladas de vinhaça represada. *Rev. Microbiol.*, 14:197-201, 1983.

AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS SOBRE O COMPONENTE RESPIRATÓRIO DE BACTÉRIAS

Evanil Pires de Campos

Deptº de Moléstias Infecciosas e Parasitárias
Faculdade de Medicina de Botucatu
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP, Brasil

Oswaldo Galvão Brasil

Deptº de Bioquímica
Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola UNESP
Campus de Botucatu

& Cláudia E.O. Pires de Campos

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola UNESP

Resumo

Efeito de antimicrobianos sobre o componente respiratório das *Klebsiella* spp. multiresistentes a drogas, identificadas do escarro de pacientes internados na Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP. As bactérias possuíam dois, três, quatro e sete modelos de resistência a drogas, estabelecidos pela concentração inibitória mínima (MIC). O efeito dos inibidores da respiração bacteriana foi avaliado pelo elektrodo polarimétrico de Clark. Houve menor capacidade de crescimento de bactérias, segundo sua multiresistência a drogas; as amostras de *Klebsiella* T₁₈ e T₄₃ mostraram-se sensíveis à ação do ácido salicil-hidroxâmico (SHAM). *Klebsiella* T₃, com dois modelos de resistência, sensível ao KCN, após crescer em meio de cultura que continha cloranfenicol, mostrou-se insensível a KCN, porém sensível a SHAM. Os antimicrobianos usados em infecções pulmonares induziram o aparecimento de uma via respiratória resistente a KCN ou proporcionaram a seleção de mutantes resistentes, pré-existentes, capazes de utilizarem uma via respiratória alternada.

Summary

Effect of antimicrobial agents on the respiratory component of bacteria

Klebsiella sp. multiresistant to drugs were identified from the sputum of patients inmate in the Infirmary of Infectious Disease of Medicine School of Botucatu - UNESP. The bacteria had two, three, four and seven resistant models to drugs, established by minimum inhibitory concentration. The effect of inhibition of bacterial

respiration was estimated with a Clark polarimetric electrode. The results that the smaller capacity of bacterial growth concerns the multi-resistant to drugs: *Klebsiella* sp. T₁₈ and T₄₃ were sensitive to salicil hidroxilamic acid (SHAM). The *Klebsiella* sp. T₃ with two models of resistance, sensible to KCN, was resistant to KCN but sensitive to the SHAM after growing in medium with chloramphenicol. The antimicrobial drugs utilized in pulmonary infections could induce the appearing of respiratory pathway resistant to KCN or selection of pre existing resistant mutants able of utilized the alternative respiratory pathway alternative.

Introdução

Os estudos das curvas de crescimento e dos modelos de resistência de diferentes microrganismos têm permitido inúmeras interpretações (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 20, 25, 26, 29). Os autores, de uma maneira geral afirmam que há relação direta entre o modelo de resistência e a curva de crescimento dos diversos microrganismos estudados. Esses trabalhos mostraram que as bactérias, com dois e três modelos de resistência, apresentaram melhor crescimento quando comparados às que possuem quatro ou mais modelos de resistência a drogas (2, 3, 4, 7, 8, 9, 13, 25, 26, 29). As explicações para os fatos acima relatados são várias.

Neste trabalho, estudou-se o efeito de antimicrobianos sobre o componente respiratório de bactérias multiresistentes, isoladas do escarro de doentes com infecções pulmonares agudas.

Material e Métodos

Klebsiella spp. foram isoladas do escarro de doentes internados com infecções pulmonares agudas na Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

O diagnóstico da infecção pulmonar foi estabelecido com base nos dados clínicos, radiológicos e microbiológicos obtidos no momento da internação.

O escarro purulento permitiu realizar o isolamento e a identificação das bactérias para o presente estudo.

Os modelos de resistência foram previamente estabelecidos, através da concentração inibitória mínima (M.I.C.) e do nível de resistência (N.R.) a drogas, pelo método da diluição em placas. Selecionaram-se seis *Klebsiella* spp. que possuíam 2, 3, 4 e 7 modelos de resistência a drogas, com o objetivo de se estudar o comportamento respiratório frente aos antimicrobianos.

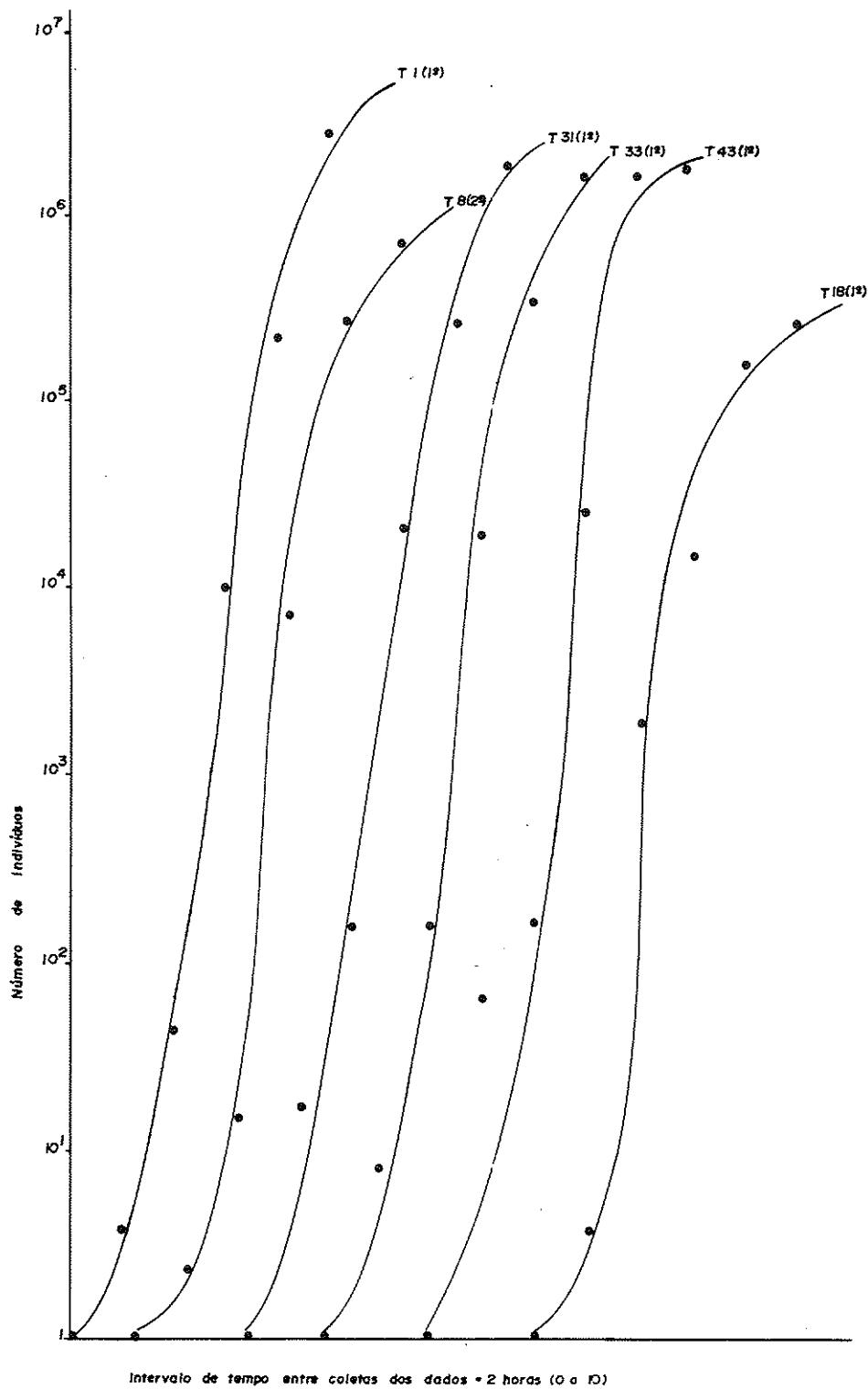
As curvas de crescimento bacteriano foram realizadas após cultivos em B.H.I. (Brain Heart Infusion) por 24 horas a 37°C com alíquotas colhidas a cada seis horas. O crescimento foi determinado pela contagem direta do número de bactérias encontradas nas placas semeadas (Fig. 1).

Para o estudo da respiração bacteriana utilizou-se cultura de amostras com 15 a 20 horas de crescimento a 37°C. O consumo de oxigênio foi medido com auxílio de um oxígrafo de volume e temperatura padronizados, ao qual se ligou um eletrodo tipo Clark, segundo Estrabrook (14).

Os dados obtidos foram determinados por um registrador modelo 291/MM de Varian S/A acoplado ao sistema.

Os efeitos dos inibidores da respiração bacteriana foram avaliados pelo uso de 0,2mL da amostra em 1,8mL de B.H.I., adicionados à cubeta de 2mL. Diferentes concentrações de KCN (cianeto de potássio), SHAM (ácido salicilhidroxâmico), antimicina A e Rotenona, em volume de 10µL foram adicionadas à cubeta para o estudo proposto.

Figura 1 - Curvas de crescimento de *Klebsiella* spp. com 2, 3, 4 e 7 modelos de resistência a drogas T₁, T₈, T₃₁, T₃₃, T₄₃ e T₁₈, respectivamente



Procedeu-se ao cálculo da constante de inibição (K_i) para o SHAM através da medição do consumo de oxigênio da bactéria em várias concentrações de SHAM (100, 200, 300 e 400 μM). A constante de inibição para o SHAM, frente à ação inibitória da respieração bacteriana, foi calculada segundo Dixon & Webb (10).

Resultados

As curvas de crescimento de *Klebsiella* spp. com dois (T_{18} , T_{43} e T_{31}), três e quatro (T_{33} e T_{43}) e sete (T_{18}) modelos de resistência acham-se, respectivamente, expressadas na Figura 1. As curvas evidenciam que houve menor capacidade de crescimento das bactérias, de acordo com sua multiresistência a drogas. Verificou-se que T_{18} possui maior modelo de resistência e menor taxa de crescimento. A T_{43} apresentou maior taxa de crescimento.

A presença de componentes da cadeia respiratória, foi confirmada pelo uso de inibidores clássicos da respiração: Rotenona, inibidora de flavoproteínas, Antimicina, inibidora do citocromo b e o Cianeto de potássio (KCN), inibidor da citocromo-oxidase (5, 6, 11, 12, 18, 19, 21, 22, 28, 30).

A respiração de *Klebsiella* T_{18} e T_{43} mostrou-se insensível à ação do KCN e sensível a ação do SHAM (Figs. 2 e 3).

Figura 2 - Efeitos de KCN e de SHAM no consumo de oxigênio ($\mu\text{moles O}_2$ - 0,2ml de cultura/minuto) sobre *Klebsiella* sp. T_{18} (1 α)

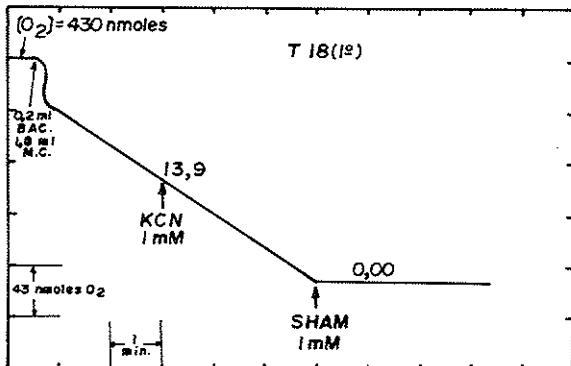
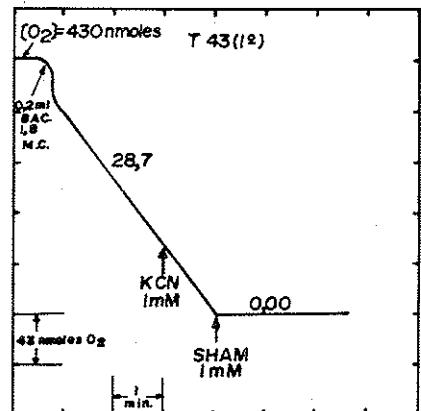


Figura 3 - Ação de KCN (1 μM) e de SHAM (1mM) no consumo de oxigênio ($\mu\text{moles O}_2/0,2\text{ml de cultura/minuto}$) sobre *Klebsiella* sp. T_{43} (1 α)



Klebsiella T_3 apresentou comportamento distinto, frente aos inibidores da respiração, KCN e SHAM, quando em BHI e em meio onde se adicionou cloranfenicol. Naquele, a respiração bacteriana mostrou-se sensível a KCN e insensível a SHAM (Fig. 4). Neste, com cloranfenicol, a respiração passou a ser insensível a KCN e sensível a SHAM (Fig. 5).

A constante de inibição do SHAM, calculada para a *Klebsiella* T_{18} sensível a SHAM, foi de 115 μM (Fig. 6).

Discussões

As explicações, para o diferente crescimento de T_{18} , frente às demais bactérias estudadas, acham-se contidas em três hipóteses a saber: primeira, a presença do

elemento extracromossômico (plasmídeo), que seria responsável pela maior dificuldade do crescimento bacteriano; segunda, a presença desse gene extracromossômico levaria as células dos microrganismos a apresentarem maior atividade metabólica no momento da multiplicação e, a terceira, os plasmídeos presentes nas células bacterianas possuiriam diferentes pesos moleculares, segundo os modelos de resistência que transportassem (1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 13, 25, 26, 29).

O uso de inibidores da cadeia respiratória, em *Klebsiella* sp., evidenciou a presença de alguns componentes do sistema de transporte eletrônico a saber: flavoproteínas inibidas pela Rotenona e o citocromo b, inibido pela Antimicina (19, 21, 22, 27, 30).

As bactérias estudadas apresentaram comportamento diferente, quando se usou, como inibidores da respiração, o KCN, para o sistema citocromo oxidase e o SHAM, inibidor da via respiratória, normalmente insensíveis ao KCN.

Klebsiella T₁₈ e T₄₃ mostraram comportamento respiratório resistente a KCN e redução do consumo de oxigênio (Figs. 2 e 3). Apresentaram, também, crescimento lento, quando comparadas às bactérias que possuíam menor modelo de resistência (Fig. 1).

Esses dados permitiram supor a presença de uma via respiratória, resistente a KCN (5, 6, 11, 12, 14, 18, 19, 21, 22, 27, 28, 30).

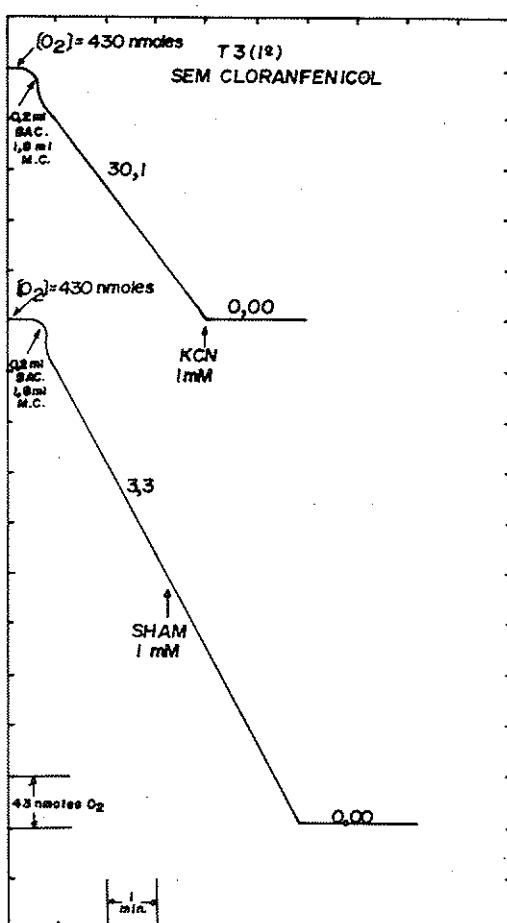
Sabe-se que, em fungos, há uma via respiratória alternada, insensível ao cianeto de potássio, como mecanismo provável de defesa celular, diante dos antimicrobianos. Essa via alternada pode ser relacionada com os modelos de resistência, devido ao fato do cloranfenicol induzir sua utilização, quando adicionado aos meios de crescimento dos microrganismos resistentes (11, 12, 21, 28).

O estudo de *Klebsiella* T₃₁, em condições de crescimento, com ou sem cloranfenicol, permitiu obter resultados semelhantes aos da literatura (11, 12, 22, 28).

Os autores propuseram a seguinte explicação para os fatos observados: primeira, a seleção de mutantes da T₁₈ e T₃₁, cultivados em cloranfenicol, permitiu evidenciar que existe a possibilidade da utilização de uma via respiratória alternada sensível a SHAM. A segunda, a exemplo do que se verificou em fungos, houve indução, pelo antibiótico, da utilização de uma via respiratória, insensível ao cianeto de potássio (5, 6, 11, 12, 28) (Figs. 4 e 5).

Os resultados, obtidos com as bactérias T₁₈ e T₃₁, permitiram ilações, tanto no sentido de via respiratória, quanto na da multiresistência a drogas. A T₁₈ com 7 e a T₃₁ com 2 modelos mostraram, inicialmente, comportamento respiratório diferente. Esse fato, talvez, pudesse sugerir que T₁₈, pela elevada multiresistência a drogas, utilizasse as duas vias respiratórias, como proteção à ação dos antimicrobianos. Essa hipótese parece ter fundamento. Sabe-se que algumas substâncias, como a acri-

Figura 4 - Ação de KCN (1µM) e de SHAM (1mM) no consumo de oxigênio (µmol O₂/0,2ml/minuto) sobre *Klebsiella* sp. T₃ (1^a) cultivada em meio com 50mg/ml de cloranfenicol



flavina, são capazes de eliminar plasmídios. Cultivando-se T₁₈, em meios que possibilitem a eliminação do plasmídio, poder-se-ia inferir, corretamente, se a via respiratória alternada estaria ou não ligada a gene extracromossômico.

Figura 5 - Efeitos de KCN e de várias concentrações de SHAM (100, 400, 600, 800 e 1000 μ M) sobre a respiração de *Klebsiella* sp. T₃ (1^o) cultivada em meio com 40mg/ml de cloranfenicol

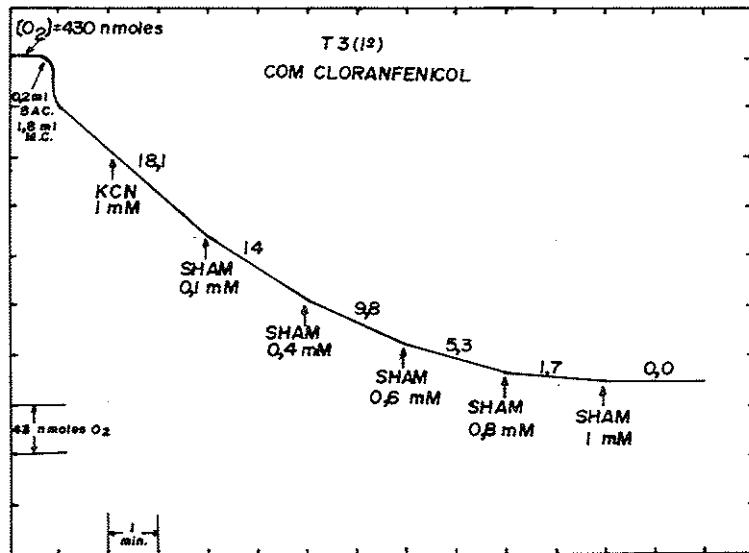
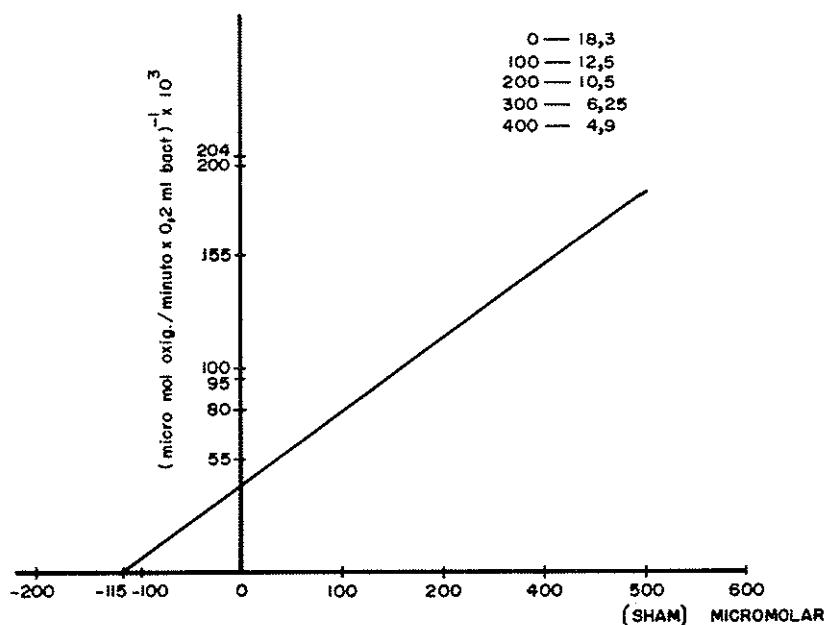


Figura 6 - Inverso da taxa da respiração em função da concentração de SHAM.

Símbolos: $Y = 0,00037X + 0,0430$; $r = 0,973$; $R_i = -115 \mu M$



Excluída essa hipótese, estudar-se-ia o DNA da célula bacteriana, para se verificar a possível interferência ou não, desse ácido nucleico, sobre os componentes da via respiratória bacteriana (15, 16, 17, 20, 23, 24).

Tais hipóteses permanecem, para nós, abertas à investigação.

A Figura 6 (Dixon Plot) mostrou que a constante de inibição de SHAM em *Klebsiella T18* ($K_i = 115\mu M$) caracterizou uma inibição tipo competitiva. A correlação linear, obtida entre o inverso da respiração e a concentração do inibidor (SHAM), permitiu confirmar a presença de apenas uma oxidase alternada, insensível a KCN.

Referências Bibliográficas

1. Aoki-Watanabe, D.S. - Contribuição ao estudo de crescimento de *Escherichia coli* sensível e resistente a drogas por mutação e aquisição de fatores R. Botucatu, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas, 1973. (Tese de Doutoramento).
2. Aoki-Watanabe, D.S. - Influência da multi resistência a drogas sobre o crescimento de *Escherichia coli*. Rev. Microbiol., 9:44-47, 1978a.
3. Aoki-Watanabe, D.S. - Influência da resistência cromossômica e extracromossômica a drogas no crescimento de *Escherichia coli*. Rev. Microbiol., 9:31-38, 1978b.
4. Azevedo, J.L. & Neder, R.N. - Comparação entre o crescimento de *Xantomonas campestris* (Pannell Dowson). Anais Esc. Sup. Agric. Luiz Queirós, 20:149-162, 1963.
5. Bendall, D.S. & Bonner, W.D. - Cyanide insensitive respiration in plant mitochondria. Pl. Physiol., 47:236-245, 1971.
6. Chance, B. & Willians, G.R. - The respiratory chain and oxidative phosphorylation. Adv. Enzymol., 135:65-133, 1956.
7. Costa, S.O.P. & Azevedo, J.L. - Resistência bacteriana a drogas: aspectos atuais e futuros. Ars Cvrandi, 10:29-32, 1977.
8. Datta, N. - Infections drug resistance. Br. med. Bull., 21:254-259, 1965.
9. Demerec, M. - Origin of bacterial resistance to antibiotics. J. Bact., 56:673-674, 1948.
10. Dixon, M. & Webb, E.C. - Enzymes. 2.ed. New York, Academic Press, 786p., 1964.
11. Edwards, D.L.; Kwiecinski, F. & Horstmann, J. - Selection of respiratory mutants of *Neurospora crassa*. J. Bact., 144:164-168, 1973.
12. Edwards, D.L.; Rosenberg, E. & Maroney, P.A. - Induction cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem., 249:3551-3556, 1974.
13. English, A.R. & McCoy, E. - Growth comparisons of streptomycin sensitive and streptomycin resistant *Micrococcus pyogenes* var. *aureus*. J. Bact., 62:19-26, 1951.
14. Estabrook, R.W. - Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP: O Ratios. In: - Colowich, S.P. & Kaplan, N.O., ed. - Methods in enzymology. New York, Academic Press, Vol.10, p.41, 1967.
15. Gause, G.F. - Microbial models of cancer cells. New York, W.B. Saunders, 14p., 1966.
16. Gause, G.F. & Kochetkova, G.V. - Vulnerability of nucleic acids in mutant *Staphylococcus* with impaired respiration. J. Gen. Microbiol., 29:317-323, 1962.
17. Gause, G.G.; Loshkavera, N.P.; Borsky, I.B. & Gause, G.F. - DNA base composition in certain bacteria and their mutants with impaired respiration. Nature, 203:598-599, 1964.
18. Jacobs, N.J. & Conti, S.F. - Effect of hemin of the formation of the cytochrome system of anaerobically grown *Staphylococcus epidermidis*. J. Bact., 83:675-679, 1965.
19. Keilin, D. - On cytochrome, a respiratory pigment common animals, yeast and higher plants. Proc. Roy. Soc. (London), serie B, 98:312, 1925.
20. Lacey, R.W. - Antibiotic resistance plasmid of *Staphylococcus aureus* and their clinical importance. Bact. Rev., 39:1, 1975.
21. Lambowitz, A.M.; Slayman, C.W. & Slayman, C.L. - The electron transport components of wild type and poky strains of *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem., 247:1536-1545, 1972.

22. Lambowitz, A.M.; Smith, E.W. & Slayman, C.W. - Electron transport in *Neurospora* mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 247:4859-4868, 1972.
23. Lawley, P.D. & Brookes, P. - The action of alkylating agents desoxyribonucleic acid in relation to biological effects of the alkylating agents. In: - The nucleus of the cancer cells. New York, Academic Press, 1963.
24. Mitsuhashi, S.; Harada, K. & Kameda, M. - Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavina. *Nature*, 189:947-948, 1961.
25. Porto, E. & Regueiro, B. - Caracteres diferenciales entre razas sensibles y resistentes a la bencil penicilina del *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. esp.*, 15:101-124, 1962.
26. Ramsey, H.H. - The growth of sensitive and resistance strains of *Micrococcus pyogenes* in the presence of varying concentrations of chloramphenicol. *Antibiotics Chemother.*, 8:250-254, 1958.
27. Rieske, J.S. - Antimycin A. In: - Gottlieband D. & Saw, P.D., eds. - *Antibiotics. I - Mechanism of action*. Berlin, Springer, p.542-584, 1967.
28. Schonbaum, G.R.; Bonner, W.D.; Story, B.T. & Bahr, J.T. - Specific inhibition of the cianide insensitive respiratory pathway in plant mitochondria by hidrozamie acids. *Pl. Physiol.*, 47:124-128, 1971.
29. Trabulsi, L.R. - Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. *Rev. Microbiol.*, (Supl.):1-29, 1973.
30. Vernon, L.P. - Bacterial cytochromes. II - Cytochrome composition of an unidentified *Pseudomonas* capable of reducing nitrate. *J. Biol. Chem.*, 222:1045-1049, 1956.

VIABILIDAD DE DIFERENTES CEPAS BACTERIANAS EN CUATRO DILUYENTES DE USO FRECUENTE *

Renate Schoebitz
 & L. Montes

Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria
 Facultad de Ciencias Veterinarias
 Universidad Austral de Chile
 Casilla 567 - Valdivia
 CHILE

Resumen

Se analizó la acción de cuatro diluyentes sobre tres especies bacterianas, exponiendo, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus* a la acción de buffer fosfato, solución de Ringer al cuarto de concentración, agua destilada y peptona al 0,1%. A diluciones de las cepas, en cada uno de los diluyentes en estudio, se le practicó recuento bacteriano sembrando sobre agar "Plate Count" mediante el método en superficie, después de haber sido mantenidas, a temperatura ambiente por cero, una, dos, tres, veinticuatro y cuarenta y ocho horas. No se observó, para las tres especies, una marcada variación en las cifras de recuento hasta las tres horas de permanencia en cada uno de los diluyentes; sin embargo, ya a las 24 horas se detectó un marcado aumento en el recuento de la solución de peptona al 0,1%. En los demás diluyentes se apreció valores más bajos de recuento en este mismo período, lo cual se acentuó a las 48 horas. De los resultados se desprende que hasta las tres horas pueden usarse indistintamente los cuatro diluyentes frente a las cepas estudiadas, teniendo presente que en la solución de peptona al 0,1% ya a las tres horas se apreció un leve incremento en los valores de recuento bacteriano.

Summary

Viability of different bacterial strains in four commonly used diluents

In order to find out about the effect of different diluents on the viability of some bacteria, in this study *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* were exposed separately to: phosphate buffer, 0,1% peptone water, distilled water and quarter strength Ringer's solution. Dilutions of each strain in the different diluents were performed, and left at room temperature for zero, one, two, three, 24 and 48hrs. At the end of each period, plates were inoculated by the "Standard

* Trabajo financiado parcialmente con fondos de la Dirección de Investigación y Desarrollo, Proyectos S-80-20, de la Universidad Austral de Chile.

"Plate Count" method, using "Plate Count" agar. Up to three hours there was not a marked difference in the bacterial count of the species, in any of the diluents used. After 24 hours a considerable increase in number for the 0,1% peptone water was observed, while the rest of the diluents showed a decrease in their counts. The results indicate that for three hours any of the four diluents can be used, for the species studied; considering that after three hours the 0,1% peptone water already had a slight increase in their bacterial count.

Introducción

Al analizar un alimento, con frecuencia se requiere realizar diluciones del mismo, pudiéndose recurrir para ello al empleo de gran variedad de soluciones. Las preferencias por unas u otras han ido variando, en cierta medida a través del tiempo: así por ejemplo, el agua destilada que en un momento se rechazó como diluyente (13), nuevamente es aceptada con algunas limitaciones (8); el buffer fosfato recomendado inicialmente por Butterfield (2) ampliamente utilizado, especialmente para el análisis de productos lácteos, ha sido reemplazado por otras soluciones que, según se ha visto, son igualmente efectivas, o tal vez superiores al diluyente mencionado (6, 7).

Un microorganismo al ser expuesto a un medio desfavorable tiene cierta capacidad de sobrevivir en éste, según sea la especie. Si las condiciones ambientales no son demasiado adversas y causan la lisis celular, deberá recurrir a sus propias reservas para suplir la ausencia de un substrato al cual degradar (1).

Al introducir los microorganismos contenidos en un alimento en el diluyente correspondiente, se ha postulado que las partículas de alimento tendrían un efecto protector sobre las bacterias, especialmente en las concentraciones más elevadas, impidiendo que ellas sean dañadas por el diluyente (8). En un trabajo anterior realizado en leche cruda (12), no se observaron diferencias significativas para los valores de recuento bacteriano en diferentes diluyentes. Se pensó entonces que ello podría deberse a la protección de las partículas de la leche, sobre los microorganismos contenidos en ella. El presente trabajo tiene como objetivo determinar en qué medida ciertos diluyentes de uso frecuente en un laboratorio, afectan la viabilidad de cultivos puros bacterianos.

Material y Método

Para cumplir con los objetivos planteados se seleccionó cepas bacterianas tanto Gram positivas como Gram negativas, que se aislan con frecuencia del agua o alimentos. Cada una fue expuesta en forma separada a la acción de diferentes diluyentes durante diferente tiempo; un período corto de una hasta tres horas, y exposiciones más prolongadas de 24hs. y 48hs., como referencia para los cálculos comparativos posteriores, se determinó la cantidad inicial de células en cada ensayo.

Las especies bacterianas empleadas en el estudio fueron: *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Staphylococcus aureus*; obtenidas del cepario del Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria (Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile). La metódica de trabajo consistió en un cultivo previo de las diferentes especies en caldo cerebro corazón durante 18-20hrs. a 35°C, para asegurarse un máximo de células viables.

Los diluyentes estudiados fueron: buffer fosfato (2), solución de Ringer al cuarto de concentración (4), agua destilada y solución de peptona de carne al 0,1% (13). Cada una de las cepas se diluyó en las soluciones mencionadas hasta obtener aproximadamente 1×10^6 bact./g. En el caso de la peptona al 0,1% fue necesario efectuar un mayor número de diluciones por el incremento en las cifras de recuento observado después de tres horas de permanencia de las bacterias en este diluyente.

Las diluciones se dejaron a temperatura ambiente realizándose siembras después de una, dos, tres, 24 y 48 horas de exposición. Para las siembras se empleó el método en superficie sobre Agar Plate Count (Laboratorio Merck) con cinco repeticiones cada uno. De cada dilución se tomó 0.1ml depositándose sobre la placa con el medio de cultivo y esparciéndolo con una varilla de vidrio doblada en forma triangular. En cada ensayo se realizó además una siembra en el tiempo cero, o sea inmediatamente después de finalizadas las diluciones; este dato sirvió como índice del número inicial de células para cada caso. Las placas se incubaron a $35 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24hrs. para *E. coli* y *S. typhimurium*, mientras *S. aureus* se incubó 48hrs. Se contaron aquellas placas que presentaban entre 30 y 300 colonias; para facilitar el recuento bacteriano la superficie del medio en las placas debía estar totalmente seca, evitándose así la confluencia de las colonias, especialmente en el caso de *E. coli* y *S. typhimurium*.

A fin de establecer si el caldo cerebro corazón en el cual se cultivó la cepa, favorecía la viabilidad bacteriana al ser transferido durante la dilución inicial, se efectuaron muestras paralelas en las cuales se sometió el cultivo a lavados previos mediante centrifugación el diluyente correspondiente, (10 minutos a 2000rpm) posteriormente se efectuaron diluciones con el pellet de células lavadas, hasta la obtención de aproximadamente 1×10^6 bact/g. Para la interpretación estadística de los datos se empleó el análisis de varianza y el test de cuadrados mínimos significativos (5). Este último se utilizó para comparar los valores de recuento bacteriano en el tiempo cero con las cifras de los distintos períodos analizados.

Resultados y Discusion

Agua destilada - Ya en el año 1927 Winslow & Brooke (14) habían encontrado que la viabilidad de *Escherichia coli* no era afectada en agua destilada después de una hora, a diferencia de otras especies bacterianas. Butterfield (2) en cambio rechazó el uso de este diluyente por obtener resultados desfavorables al trabajar con poblaciones bacterianas provenientes de agua de río.

En el análisis de nuestros resultados, considerando en forma separada el efecto de cada diluyente sobre una bacteria específica se observa que para el caso *E. coli* en agua destilada (Tabla 1), recién a las 48hrs. de permanencia en ella, los valores de recuento disminuyen en forma significativa en relación a los valores de recuento iniciales. King & Hurst (10) también obtuvieron resultados satisfactorios dejando esta bacteria durante dos horas en agua destilada mientras otros autores aún a los cuatro días sólo observaron una leve disminución en los recuentos (15).

La cepa de *Staphylococcus aureus* se mantuvo viable en el agua destilada (Tabla 2), no observándose hasta las 24 horas una disminución significativa en las cifras de recuento respecto al tiempo cero. Esto podría deberse a que este microorganismo es resistente frente a condiciones ambientales adversas, considerándose incluso el más resistente entre las bacterias no esporuladas (3). Si bien es un microorganismo resistente, compite muy mal con la flora de descomposición de los alimentos (8) y por lo tanto en cultivo mixto con gran cantidad de flora acompañante, puede desaparecer rápidamente.

Por su parte *Salmonella typhimurium*, bacteria entérica, no muestra variaciones considerables en sus cifras de recuento (Tabla 3) después de tres horas de permanencia en agua destilada. En cambio a las 24hrs. ya se observan diferencias

Tabla 1 - Valores promedio de recuento para *Escherichia coli* expuesto a cuatro diluyentes durante diferentes tiempos.

Símbolos: (1) = Cada cifra representa el promedio de 5 repeticiones expresado en \log_{10} de bact/ml; * = Significativo al nivel del 5% ($p \leq 0,05$); ** = Significativo al nivel del 1% ($p \leq 0,01$)

Tiempo (hrs.)	Diluyentes			
	Agua destilada	Peptona al 0.1%	Buffer fosfato	Ringer ^a
0	6,00 (1)	6,36	6,01	6,05
1	5,96	6,39	5,96	6,00
2	5,94	6,39	5,95	5,98
3	5,87	6,51	5,87	5,86
24	5,40*	8,13**	5,55	5,44**
48	4,40**	10,40**	5,13**	5,06**

altamente significativas en relación al valor inicial. Este microorganismo puede sobrevivir hasta por una semana en aguas superficiales de río (11) ya que aquí encuentra materias orgánicas en suspensión disponibles, en cambio en agua destilada pura, tiene mayor dificultad para hacerlo en comparación a otros microorganismos.

En términos generales se puede decir que el agua destilada puede recomendarse como diluyente para el aislamiento de las tres especies estudiadas, considerando que *E. coli* y *S. typhimurium* a las tres horas no presentaron variaciones significativas en sus recuentos, pero si a las 24 hrs., y en el caso de *S. aureus* aún a las 24 horas, según nuestros estudios se obtienen resultados confiables en los valores de recuento.

Es importante tener en cuenta lo estudiado por Zaske & Dockins (15) quienes determinaron que al sembrar cepas dañadas de *E. coli* por exposición prolongada en agua destilada, sobre medios selectivos, dichas cepas tenían dificultad para crecer. Por ello para nuestro caso la exposición prolongada en ese diluyente sólo es aceptable si la siembra posterior se realiza sobre un medio no selectivo.

Peptona - La solución de peptona al 0,1% recomendada por Straka & Stokes (13) según nuestros antecedentes, es recomendable para la detección de las tres cepas analizadas, tomando la precaución que las bacterias no permanezcan en ella más de 24 hrs. Pasado este tiempo comienza el aumento de cifras de recuento por la multiplicación bacteriana (Tabla 1, 2 y 3).

Otro punto que debe considerarse al emplear este diluyente es la calidad de la peptona de carne ya que, por lo que se comprobó en algunos casos, ésta contiene inhibidores. Los primeros ensayos realizados mostraron una disminución gradual en las cifras de recuento en este diluyente, las que hacían significativas a las 24 hrs. Esto se observó por igual para las tres cepas. Al cambiar a otra marca comercial este fenómeno fue superado. Otro inconveniente que presenta el uso de la peptona es la excesiva formación de espuma al agitar los frascos de dilución. Pese a todo ello es un diluyente recomendable especialmente para el recuento de *Clostridium perfringens* y otros microorganismos exigentes así como en alimentos donde las bacterias pudieran estar dañadas (8).

Buffer fosfato - El buffer fosfato utilizado de rutina en el análisis de leche y productos lácteos y recomendado por Butterfield (2) ya en 1933, dió buenos resultados para *E. coli* hasta las 24 hrs. Pasado este plazo la disminución en las cifras de recuento fue altamente significativa. Lo mismo se observó para *S. aureus* (Tabla 2), siendo para *S. typhimurium* ya perjudicial a las 24 hrs. Sin embargo al compararlo con los otros diluyentes, se aprecia que éste arrojó resultados bastante favorables hasta las 24 hrs. lo cual no se obtuvo con los demás. Por ello parece recomendable su uso, sobre todo para una exposición prolongada de 24 hrs., ya que ofrece resultados más estables que los demás para las tres especies.

Tabla 2 - Valores promedio de recuento para *Staphylococcus aureus* expuesto a cuatro diluyentes durante diferentes tiempos.

Símbolos: (1) = Cada cifra representa el promedio de 5 repeticiones expresado en log₁₀ de bact/ml; ** = Significativo al nivel del 1% ($p \leq 0,01$)

Tiempo (hrs.)	Diluyentes			
	Aqua destilada	Peptona al 0.1%	Buffer fosfato	Ringer ^a
0	6,02 (1)	5,96	6,03	5,76
1	5,99	6,08	6,00	5,74
2	5,89	6,15	6,01	5,59
3	5,90	6,17	5,91	5,48
24	5,75	7,40**	5,67	5,06**
48	5,24**	8,30**	5,11**	4,98**

Tabla 3 - Valores promedio de recuento para *Salmonella typhimurium* expuesto a cuatro diluyentes durante diferentes tiempos.

Símbolos: (1) = Cada cifra representa el promedio de 5 repeticiones expresado en log₁₀ de bact/ml; * = Significativo al nivel del 5% ($p \leq 0,05$); ** = Significativo al nivel del 1% ($p \leq 0,01$)

Tiempo (hrs.)	Diluyentes			
	Aqua destilada	Peptona al 0.1%	Buffer fosfato	Ringer ^a
0	5,71 (1)	5,61	5,58	5,60
1	5,66	5,69	5,71	5,52
2	5,54	5,78	5,60	5,39
3	5,50	5,89	5,63	5,39
24	5,03**	7,53**	5,26*	4,81**
48	5,13**	10,13**	4,88**	4,48**

Gráfico 1 - Valores promedio de recuento de *E. coli* en diversos diluyentes durante diferentes tiempos de exposición

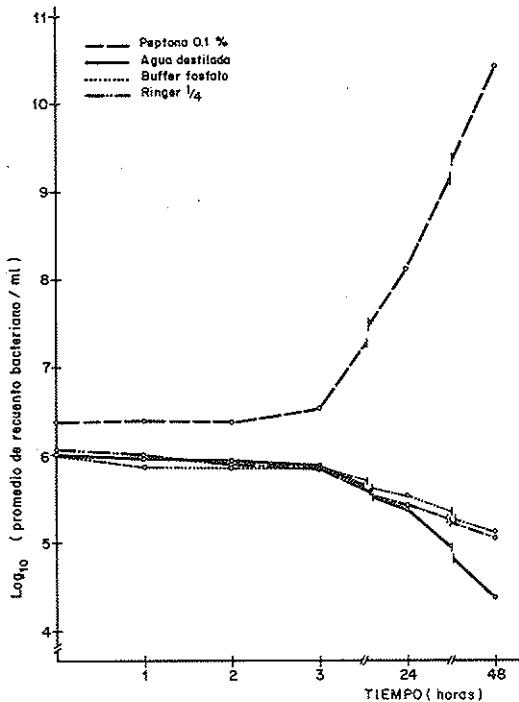
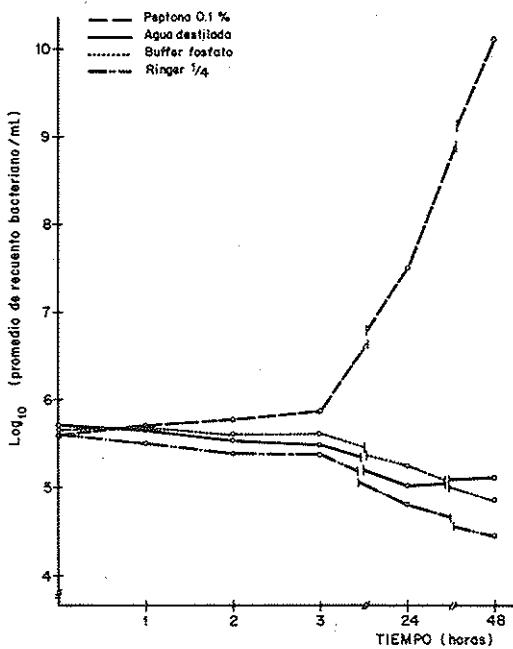


Gráfico 2 - Valores promedio de recuento de *S. typhimurium* en diversos diluyentes durante diferentes tiempos de exposición



Al comparar este diluyente con la peptona al 0,1%, Hall (6) concluyó que no existían diferencias significativas entre las cifras de recuento de ambos por espacio de una hora. Por su parte Keller & col. (9) obtuvieron mejores resultados con triptona al 0,1% que con citrato de sodio al 2% o buffer fosfato en productos lácteos acidificados.

Solución de Ringer al cuarto de concentración. - La solución de Ringer al cuarto de concentración, de acuerdo a nuestros resultados es la menos recomendable, siendo especialmente perjudicial para *S. aureus* ya a las 24hrs., obteniéndose diferencias altamente significativas en sus recuentos respecto al recuento inicial. Estos resultados en parte concuerdan con lo observado por King & Hurst (10) en lo que se refiere al efecto sobre *S. aureus*, el Ringer al cuarto de concentración no debe ser empleado. Este hecho unido a una mayor demora en su preparación hacen que sea el menos recomendable de los cuatro diluyentes analizados.

Los Graficos 1, 2 y 3 muestran comparativamente el comportamiento de las diferentes cepas frente a los diluyentes probados.

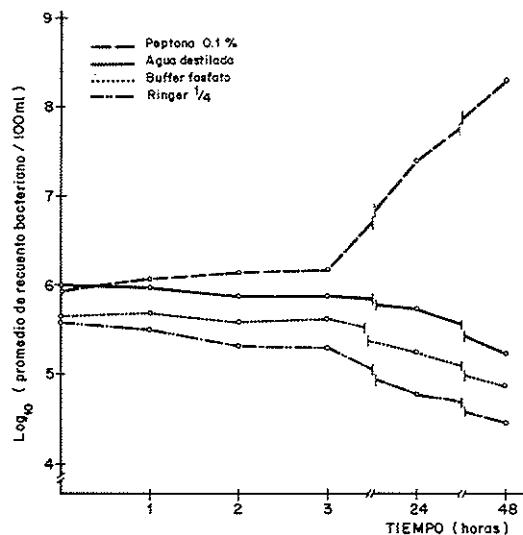
Escherichia coli - En el Gráfico 1 se observa que el agua destilada, el buffer fosfato tanto como la solución de Ringer, no afectan a *E. coli* hasta las tres horas de permanencia en ello, habiendo un posterior descenso paulatino en el número de células. Para la solución de peptona en cambio, ya a las dos horas hay un aumento en los valores de recuento, el cual asciende en forma notable a las 24 hrs. lo cual se refleja en la inclinación de la pendiente.

Staphylococcus aureus - En el Gráfico 3 se presentan los resultados obtenidos para *S. aureus* observándose una buena tolerancia al agua destilada así como al buffer fosfato, lo cual se refleja en la pendiente idéntica de ambas curva. Para la solución de peptona como ya se vio en los casos anteriores, a las dos hrs. comienza un incremento celular que se va acentuando a las 24hrs. En el caso de esta cepa la inclinación de la curva es algo menor en relación a las otras dos cepas lo cual se explica por los diferentes tiempos de generación de bacterias. Para *E. coli* este período es menor al de *S. aureus* y por ello demora menos tiempo en elevar su número de células.

No se apreció diferencias entre las muestras en que se utilizó pellet de células lavadas y aquellas en que se siguió el método usual sin lavado. Esto indica que la sobrevivencia de las bacterias en los diluyentes no se debió a pequeñas cantidades de nutrientes transferidas, sino a la propiedad misma de las bacterias de permanecer viables en éstos.

Concluyendo y de acuerdo a nuestros resultados, hasta las tres horas de permanencia, ninguno de los diluyentes presenta desventajas significativas para las cepas estudiadas. Sin embargo frente a la necesidad de una estadía prolongada de 24hrs., el buffer fosfato ofrece mayor seguridad. De acuerdo a nuestros resultados se puede concluir además que ante la ausencia de partículas alimentarias que proteja a las bacterias de la acción de los diluyentes, las cepas estudiadas no se ven afectadas por el efecto de ellos. Debe tenerse presente sin embargo que aún no se ha encontrado el diluyente ideal para todo tipo de microorganismo.

Gráfico 3 - Valores promedio de recuento de *S. aureus* en diversos diluyentes durante diferentes tiempos de exposición



Referencias Bibliograficas

1. Brock, T.D. - Biology of microorganisms. 2.ed., New Jersey, Prentice Hall, 1974.
2. Butterfield, C.T. - Experimental studies of natural purification in polluted waters. VII - The selection of a dilution water for bacteriological examinations. Public Health Report, 48:681-691, 1933.
3. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. & Wood, W.B. - Tratado de microbiología. Barcelona, Salvat, 1972.
4. Demeter, K.J. - Lactobacteriología. Zaragoza, España, Acribia, 1959.
5. Gómez, K.A. & Gómez, A.A. - Statistical procedures for agricultural research. 6.ed. Manila, Philippines, The International Rice Research Institute, 1976.
6. Hall, H.E. - Effect of diluents on the recovery of microorganisms from foods. Cincinnati, Ohio, U.S. Department of Health, Education and Welfare/Public Health Service / Food and Drug Administration Division of Microbiology, 1970.
7. Huhtanen, C.N.; Brazis, A.R.; Arledge, W.L.; Donnelly, C.B.; Ginn, R.E.; Randolph, H.E. & Koch, E.J. - A comparison of phosphate buffered and distilled water dilution blanks for the standard plate count of raw-milk bacteria. J. Milk Food Technol., 38:264-268, 1975.
8. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.

9. Keller, P.; Sklan, D. & Gordin, S. - Effect of diluents on bacterial count in milk and milk products. *J. of Dairy Sc.*, 57:127-128, 1974.
10. King, W.L. & Hurst, A. - A note on the survival of some bacteria in different diluents. *J. Appl. Bacteriol.*, 26:504-506, 1963.
11. Mitchell, R., ed. - *Water pollution microbiology*. New York, Wiley-Interscience, 1972.
12. Schoebitz, R. & Gesche, E. - Efecto de diferentes diluyentes y tiempos de incubación sobre el recuento bacteriano en leche cruda. *Bol de I. Salud Pública*, 21:32-37, 1979/1980.
13. Straka, R.P. & Stokes, J.L. - Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. *Appl. Microbiol.*, 5:21-25, 1957.
14. Winslow, C.E.A. & Brooke, O.R. - The viability of various species of bacteria in aqueous suspensions. *J. Bacteriol.*, 4:235-243, 1927.
15. Zaske, S.K.; Dockins, W.S. & Peters, G.A. - Cell envelope damage in *Escherichia coli* caused by short-term stress in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:386-390, 1980.

RESISTÊNCIA A DROGAS, LISOGENIA E PRODUÇÃO DE COLICINAS E HEMOLISINAS EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÉNICAS

Maria de Lourdes Monteiro da Silva

Marila Akemi Yamamoto

& Norma P. Franco Severo

Deptº de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Escola Paulista de Medicina

Caixa Postal 20342

01000 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foram estudadas 90 amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC), pertencentes a 10 diferentes sorogrupo, em relação à resistência a drogas, lisogenia e produção de colicinas e hemolisinas. Oitenta e oito amostras foram resistentes de uma a nove drogas sendo que as amostras dos sorogrupo 055, 0111, 0119 e 0142 apresentaram resistência a um maior número de drogas. Cinco amostras eram colicinogênicas, duas hemolíticas e duas lisogênicas. Os sorogrupo, envolvidos nessas características, foram 026, 055, 0111 e 0119. Os resultados sugerem que colicinas e hemolisinas não constituem fatores de virulência, nas amostras estudadas.

Summary

Drug resistance, lisogeny and production of colicin and hemolysin among enteropathogenic Escherichia coli strains

Ninety strains of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) belonging to ten different serogroups were studied regard drug resistance, lisogeny and production of colicin and hemolysin. Eighty-eight strains were resistant to 1-9 drugs and the higher frequency of multi-resistance was found among the strains of serogroups 055, 0111, 0119 and 0142. Five strains produced colicin, two were hemolytic and two lisogenic. They belonged to serogroups 026, 055, 0111 and 0119. The results suggest that colicin and hemolysin are not the virulence factors of the strains studied.

Introdução

Determinados sorogrupo de *Escherichia coli* têm sido descritos como agentes etiológicos da diarréia infantil, principalmente em países tropicais. Esses sorogrupo constituem as chamadas *E. coli* enteropatogênicas clássicas ou EPEC. No Brasil, os sorogrupo mais comuns são 026, 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0128 e 0142. Entre esses, os isolados mais frequentes são 0111 e 0119 (14).

Embora a literatura cite que a incidência de diarréia por EPEC atinja crianças de até 5 anos de idade, em nosso meio as crianças afetadas têm, em sua maioria, de 0 a 5 meses de idade (20).

O mecanismo de patogenicidade desse grupo de bactérias não foi ainda estabelecido. Dois fatores de virulência têm sido pesquisados intensamente, seguindo o modelo descrito para as *E. coli* enterotoxigênicas: a produção de toxinas e a presença de fatores de colonização.

Até o momento foram descritas a toxina VERO (VT), produzida principalmente por amostras dos sorogrupo 026, 0128 e 0157 (9, 11, 18) e as toxinas produzidas por amostras dos sorogrupo 0114, 0127, 0128 e 0142 (10).

Por outro lado, aderência ao epitélio intestinal foi observada em uma amostra 026 (22) uma 0125 (21) e amostras do sorogrupo 0119 (16). Foi descrita a aderência a células Hep-2 (3) e a células epiteliais (13).

Outros aspectos têm sido pesquisados, não só entre EPEC, mas em amostras de *E. coli* em geral. Trabalhos recentes (7) mostraram que há maior frequência de amostras hemolíticas entre as isoladas de urina do que em sangue (42 e 29% respectivamente). Estudo da atividade hemolítica em amostras de *E. coli* enterotoxigênicas e não enterotoxigênicas revelou amostras hemolíticas pertencentes a nove sorogrupo, sendo a maioria 06:H⁻ (5).

A produção de colicinas também tem sido investigada. A produção de colicina V foi observada em amostras de *E. coli* isoladas de sangue, urina e fezes de pacientes com infecção urinária (4), tendo sido descrito um plasmídio responsável pela produção de colicina e a adesão de uma amostra 026 ao epitélio intestinal (22).

O objetivo deste trabalho foi estudar amostras de *E. coli* enteropatogênicas clássicas, isoladas em São Paulo, em relação a algumas características, excetuando-se a produção de toxinas e fatores de colonização. Assim, foram pesquisadas a resistência a drogas, lisogenia e a produção de colicinas e hemolisinas.

Tabela 1 - Número de amostras de *E. coli* enteropatogênicas clássicas de acordo com os sorogrupo. Símbolos: NT = não testado

Material e Métodos

Amostras - Foram estudadas 90 amostras de *E. coli*, isoladas em São Paulo, nos anos de 1981 e 1982, através da Disciplina de Microbiologia, da Escola Paulista de Medicina. Oito amostras foram isoladas a partir de fezes de crianças sadias e as demais de crianças diarréicas. As amostras pertenciam aos sorogrupo 026, 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128 e 0142 (Tabela 1). *E. coli* K12 MA335 foi usada como amostra sensível, nos testes de lisogenia e colicinogenia.

Resistência a drogas - Foi testada a resistência das amostras a dez drogas, através de antibiogramas, seguindo-se a técnica descrita por Bauer & col. (2). Foram utilizados discos Difco de sulfadiazina (Su), estreptomicina (Sm), tetraciclina (Tc), cloranfenicol (Cm), canamicina (Km), ampicilina (Ap), bactrim (associação de drogas) (Bc), cefalotina (Cf), gentamicina (Gm) e ácido nalidíxico (An). O meio de cultura utilizado foi o Mueller Hinton Agar (BBL Microbiology Systems).

Produção de colicinas - A técnica utilizada foi a descrita por Azevedo & Costa (1). As linhagens foram cultivadas em meio LB e testadas em placas de meio L, contendo 2% de agar com uma camada superior com agar a 0,2%.

Produção de hemolisinas - As amostras foram crescidas em Columbia Agar Base (Oxoid), acrescido de hemácias de carneiro a 5% lavadas previamente com PBS. As placas foram incubadas por 16-20h a 37°C e lidas quanto à presença de um halo de hemólise.

Lisogenia - Os testes foram feitos, como descrito anteriormente (19), utilizando-se como amostra indicadora a *E. coli* K12 MA335.

Sorogrupo	Sero-tipo	Nº amostras
026	026:H ⁻	3
	026:H11	1
055	055:H ⁻	4
	055:H6	5
	055:H7	1
086	086:H8	1
	086:H34	1
0111	0111:H ⁻	23
	0111:H2	11
	0111:H6	1
	0111:H9	2
	0111:H25	1
	0111:H NT	1
0119	0119:H2	1
	0119:H6	8
	0119:H NT	1
0125	0125:H ⁻	5
	0125:H6	1
0126	0126:H20	1
0127	0127:H NT	1
0128	0128ab:H2	1
	0128ab:H35	5
	0128ab:H NT	1
0142	0142:H ⁻	2
	0142:H2	5
	0142:H6	2
	0142:H NT	1
Total		90

Resultados

As amostras apresentaram resistência de uma a nove drogas, sendo que duas amostras eram sensíveis às 10 drogas utilizadas. A maior incidência de amostras multirresistentes ocorreu nos sorogrupos 055, 0111, 0119 e 0142, enquanto que as do sorogrupo 026 apresentaram menor modelo de resistência (Tabela 2). Considerando a resistência para cada droga, por sorogrupo (Tabela 3), observa-se que a frequência de amostras resistentes a qualquer droga é maior entre as amostras dos sorogrupos 0111, 0119 e 0142 do que entre aquelas dos sorogrupos 026, 055, 0125 e 0128. Nenhuma amostra foi resistente ao cloranfenicol no sorogrupo 0125, e à canamicina e bactrim, no 026. De modo geral, a resistência à gentamicina ainda é baixa, quando comparada com as outras drogas, enquanto que é quase nula ao ácido nalidíxico.

O número de amostras colicinogênicas e hemolíticas entre as EPEC estudadas é pequeno. Das 90 amostras pesquisadas, somente cinco produzem colicinas e três são hemolíticas. Das cinco amostras colicinogênicas, três pertencem ao sorogrupo 0111 e as outras duas, aos sorogrupos 055 e 0119. Amostras hemolíticas foram encontradas apenas nos sorogrupos 026 e 0111.

Quanto à lisogenia, apenas duas amostras do sorogrupo 0111 eram lisogênicas.

Discussão

As amostras dos sorogrupos 055, 0111, 0119 e 0142 apresentaram resistência a maior número de drogas do que as amostras dos demais sorogrupos. É importante salientar que esses quatro sorogrupos têm sido isolados frequentemente em nosso meio (20). Por outro lado, amostras dos sorotipos 0111:H2 (dez amostras) e 0142:H2 (cinco amostras) apresentaram o mesmo modelo de resistência ($SuSmTcCmKmApBcCfGm$ e $SuSmTcCmKmApBcCf$, respectivamente), embora tivessem sido isoladas de crianças, atendidas em diferentes hospitais de São Paulo.

O pequeno número de amostras colicinogênicas, encontrado, confirmou estudos anteriores, realizados em nosso laboratório, com 152 amostras, isoladas entre 1963 e 1978, que revelaram sete amostras produtoras de colicinas e pertencentes aos sorogrupos 026, 0111 e 0119 (dados não publicados). Esses dados mostraram que, em São Paulo, a produção de colicinas é característica de somente alguns sorogrupos de EPEC e, ainda assim, em pequeno número de amostras.

Apenas um trabalho foi encontrado na literatura, relatando a produção de colicinas em EPEC. Os autores, da União Soviética, encontraram colicinogenia em 64% das amostras do sorogrupo 055, 49,8% do sorogrupo 026 e 10,7% do sorogrupo 0111 (12). Embora haja coincidência nos três sorogrupos colicinogênicos, as frequências observadas aqui e as relatadas na União Soviética não são equivalentes.

A baixa frequência de amostras hemolíticas entre as EPEC já havia sido observada em nosso laboratório, com as amostras citadas anteriormente, isoladas em 1963-1978. Das 152 amostras, sete do sorogrupo 026 e uma 0119 eram hemolíticas (dados não publicados). É interessante ressaltar a maior frequência dentre as amostras hemolíticas do sorogrupo 026. Por outro lado, cumpre salientar que se observou a perda dessa característica após estocagem prolongada. Ela pode ser explicada pelo fato da produção de hemolisinas em *E. coli* ser codificada por plasmídios Hly (6, 8) e, portanto, com probabilidade de segregação.

Não se encontrou, na literatura, dados sobre a produção de hemolisinas entre *E. coli* enteropatogênicas clássicas, em amostras isoladas em outras localidades. Entretanto, o trabalho de DeBoy II & col. (5) relata a presença de amostras hemolíticas dos sorotipos 020:H⁻ e 0128:H7. O sorogrupo 020, também considerado enteropatogênico, não foi incluído neste estudo, por ser raro em São Paulo.

Tabela 2 - Multirresistência encontrada nos diferentes sorogrupos de *Escherichia coli* (EPEC)

Sero- grupos	Total	Sensíveis	Nº de amostras Resistentes		
			1-3 drogas	4-6 drogas	7-8 drogas
026	4	0	3	1	0
055	10	1	2	1	6
086	2	0	0	1	1
0111	39	0	3	8	28
0119	10	0	0	4	6
0125	6	1	1	3	1
0126	1	0	0	1	0
0127	1	0	0	1	0
0128	7	0	3	4	0
0142	10	0	0	4	6
Total	90	2	12	28	48

Os resultados obtidos neste trabalho levam a concluir que a produção de colicina e de hemolisinas não constitui fator de virulência nas amostras de *E. coli* enteropatogênicas clássicas, investigadas. Essas características são frequentes, em amostras enterotoxigênicas, isoladas de animais ou de alimentos processados à base de carnes (6, 17), e o seu papel, na patogenicidade da bactéria, tem sido discutido.

Quanto à lisogenia, os resultados agora obtidos confirmaram os dados encontrados anteriormente neste laboratório (19). Entre as EPEC, a lisogenia é uma característica de amostras do sorotipo O111, isoladas entre 10 e 20 anos atrás, tendo seu número diminuído com o passar dos anos (19).

Não se sabe qual o papel das amostras lisogênicas entre as EPBC. O fato, de somente as amostras isoladas há anos serem lisogênicas, sugere que pertenciam a um grupo de amostras também comuns em outros países, como a União Soviética (12) e que foram substituídas

por outras não lisogênicas. Outra hipótese é que se estaria diante de um caso de perda de repressão do estado lisogênico, pela estocagem durante anos. De qualquer forma, não se pode relacionar a lisogenia com a virulência de *E. coli* enteropatogênicas clássicas. Tentou-se a cura de amostra lisogênica por radiação ultra-violeta, para se estudar o papel do profago em questão, sem resultado (dados não publicados).

Estudos estão sendo realizados com as mesmas amostras deste trabalho quanto à produção de toxinas e pesquisa de fatores de colonização.

Agradecimentos

Este trabalho foi mantido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Planos Integrados de Genética (III e IV) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Referências Bibliográficas

1. Azevedo, J.L. & Costa, S.O.P. - Exercícios práticos de genética. São Paulo, Nacional/Edusp, 1973.
 2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic-susceptibility testing by a standardized single disk method. *J. Clin. Pat.*, 45:493-496, 1966.
 3. Cravioto, A.; Gross, R.J.; Scotland, S.M. & Rowe, B. - An adhesive factor found in strains of *E. coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenics serotypes. *Current Microbiol.*, 3:95-99, 1979.
 4. Davies, D.L.; Falkiner, F.R. & Hardy, K.G. - Colicin V production by clinical isolates of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 31:547-579, 1981.
 5. DeBoy II, J.M.; Wachsmuth, I.K. & Davis, B. - Hemolytic activity in enterotoxigenic and non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 12:193-198, 1980.
 6. Elwell, L.P. & Shipley, P.L. - Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Annu. Rev. Microbiol.*, 34:465-496, 1980.

Tabela 3 - Número de amostras de *E. coli* resistentes a cada droga nos diferentes soroagrupos.

Símbolos: ^a = Os sorogrupos 086, 0126 e 0127 foram omitidos devido ao pequeno número de amostras; Su = sulfadiazina; Sm = estreptomicina; Tc = tetraciclina; Cm = cloranfenicol; Km = canamicina; Ap = ampicilina; Bc = bactrin; Cf = cefalotina; Gm = gentamicina; AN = ácido nálico.

Sorogrupo ^a	Total	Nº de amostras Resistentes									
		Su	Sm	Tc	Cn	Rm	Ap	Bc	Cf	Gm	An
026	4	3	3	1	2	0	3	0	2	0	0
055	10	8	7	6	4	8	7	7	7	1	0
0125	6	4	3	4	0	2	3	3	2	0	0
0128	7	5	4	4	1	2	6	3	4	0	0
0111	39	38	35	34	30	31	36	31	31	17	1
0119	10	10	7	8	8	8	10	7	8	4	1
0142	10	10	9	9	8	9	6	10	7	0	0
Total	86	78	68	66	53	60	71	61	61	22	2

7. Evans Jr., D.J.; Evans, D.G.; Höhne, C.; Noble, M.A.; Haldane, E.V.; Lior, H. & Young, L.S. - Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.*, 13:171-178, 1981.
8. Goebel, W.; Royer-Pokora, B.; Lindenmaier, W. & Bujard, H. - Plasmids controlling synthesis of hemolysin in *Escherichia coli*: molecular properties. *J. Bact.*, 118:964-973, 1974.
9. Johnson, W.M.; Lior, H. & Bezanzon, G.S. - Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet*, 1:76, 1983.
10. Klipstein, F.A.; Rowe, B.; Engert, R.F.; Short, H.B. & Gross, R.J. - Enterotoxigenicity of enteropathogenic serotypes of *Escherichia coli* isolated from infants with epidemic diarrhea. *Infect. Immun.*, 21:171-178, 1978.
11. Konowalchuk, J.; Speirs, J.I. & Stavric, S. - Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 18:775-779, 1977.
12. Kudlay, D.G.; Petrovskaya, V.G. & Tashpulatov, R.Y. - Episomic determinants of heredity in the *Enterobacteriaceae*. In: - Cos, B.S. & Huizinga, J., eds. - Heredity and variability of microorganisms. Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, p.15-18, 1962.
13. McNeish, A.S.; Turner, P.; Fleming, J. & Evans, N. - Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet*, 2:946-948, 1975.
14. Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. - Aspectos etiológicos e epidemiológicos das diarréias infecciosas bacterianas. In: - Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. São Paulo, Atheneu, p.11-24, 1981.
15. Reis, M.H.L.; Castro, A.F.P.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Production of heat-stable enterotoxin by the O128 serogroup of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 24:289-290, 1979.
16. Rothbaum, R.; McAdams, A.J.; Gianella, R. & Partin, J.C. - A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology*, 83:441-454, 1982.
17. Scaletsky, I.C.A.; Silva, M.L.M.; Reis, M.H.L. Trabulsi, L.R. - *Escherichia coli* strains producing LT toxin isolated from processed food. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 13:236-241, 1982.
18. Scotland, S.M.; Day, N.P. & Rowe, B. - Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of *Escherichia coli* belonging to traditional enteropathogenic serogroups. *FEMS Microbiol. Lett.*, 7:15-17, 1980.
19. Silva, M.L.M.; Severo, N.P.F.; Puccia, R.; Costa, L.L.P. & Trabulsi, L.R. - Lysogeny among enteropathogenic *E. coli* strains isolated in São Paulo, between 1963 and 1981. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 13:325-332, 1982.
20. Toledo, M.R.F.; Alvariza, M.C.B.; Murahovschi, J.; Ramos, S.R.T.S. & Trabulsi, L.R. - Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. *Infect. Immun.*, 39:586-589, 1983.
21. Ulshen, M.H. & Rollo, J.L. - Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man: another mechanism. *New Engl. J. Med.*, 302:99-101, 1980.
22. Williams, P.H.; Sedgwick, M.I.; Evans, N.; Turner, P.J.; George, R.H. & McNeish, A.S. - Adherence of an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjugative plasmid. *Infect. Immun.*, 22:393-402, 1978.

REGULATION OF L-LACTATE DEHYDROGENASE LEVELS IN DACTYLIUM DENDROIDES

Vanete Thomaz
Glaci T. Zancan
& Shigehiro Funayama

Deptº de Bioquímica
Universidade Federal do Paraná
Caixa Postal 939
80000 Curitiba PR, Brasil

Summary

The synthesis of pyridine nucleotide independent L-lactate dehydrogenase was induced by sodium lactate in both growing and resting cells of *Dactylium dendroides*. All non-sugar carbon sources, such as ethanol, glycerol and pyruvate were inefficient as inducing agents. Experiments with cycloheximide indicated that induction of enzyme synthesis depends on "de novo" synthesis. Addition of glucose to induced growing cells caused a rapid loss of lactate dehydrogenase activity. The glucose effect was not reverted by the addition of 1 or 5 mM dibutyryl cyclic AMP suggesting that cyclic AMP is not involved in the mechanism of catabolic repression in *Dactylium dendroides*.

Resumo

Regulação dos níveis de desidrogenase láctica em Dactylium dendroides

A síntese da lactato desidrogenase, piridino nucleotídeo independente foi induzida pelo lactato de sódio em células de *Dactylium dendroides* em crescimento e em repouso. Outras fontes de carbono, tais como etanol, piruvato e glicerol se mostraram ineficientes como agentes indutores. Experiências com cicloheximida indicam que a indução da síntese da enzima depende de síntese "de novo". Adição de glucose à células induzidas em crescimento causa um rápido decréscimo da atividade da lactato desidrogenase. O efeito da glucose não foi revertido pela adição de dibutiril AMP cíclico (1 e 5mM) sugerindo que o AMP cíclico não estaria envolvido na repressão catabólica em *D. dendroides*.

Introduction

Cell free extracts of *Dactylium dendroides* grown on glucose have extremely low levels of pyridine nucleotide independent L-lactate dehydrogenase (PNLDH), whereas extracts from mycelia harvested after 36 to 48 hours of growth on lactate showed high enzyme levels (6). Similar enzymes have been studied in bacteria (22, 23, 24), yeast (16) and fungi (19, 25) but nothing is known about their kinetics of induction and repression "in vivo". In this paper we describe some aspects of induction and repression by glucose on PNLDH in *Dactylium dendroides*.

Material and Methods

Chemicals - Sodium lactate, sodium pyruvate and cycloheximide were obtained from Sigma Chemical Co. DL-Lactic acid was purchased from E. Merck and converted to the sodium salt by titration with NaOH. The electron acceptor 2,6 dichlorophenolindophenol (DCIP) was also obtained from E. Merck.

Organism and growth conditions - The strain of *Dactylium dendroides* (9) (formerly designated *Polyporus circinatus*) was from our collection. Stock cultures were maintained on slants of agar-Sabouraud containing 1% glucose. Unless otherwise indicated the mycelia were grown in a minimal medium described by Markus & col. (14) containing 5 μ g/ml of thiamine hydrochloride.

Appropriate amounts of ethanol, D-glucose, glycerol, DL-lactate or pyruvate were added to the minimal medium in order to determined by using the extinction coefficient of 2,6 dichlorophenolindophenol (2).

Protein determination - Protein concentrations were determined by the method of Lowry & col. (11) after precipitation with 5% trichloroacetic acid using bovine serum albumin as standard. Protein in whole cells was measured according to Jayaraman & col. (8).

Dry weight determinations - Mycelia were harvested by suction filtration on filter paper, washed with distilled water and dried to 60°C to constant weight.

Results

Induction of PNILDH synthesis on growing cells - Table 1 shows the specific activity of PNILDH in *Dactylium dendroides* grown on different carbon sources. The enzyme is observed in its highest level by growing the mold on lactate. The rate of synthesis of PNILDH in growing cells, using lactate as inducer, was plotted against relative growth (Fig. 1). The differential rate of synthesis of PNILDH was 1.5mU/mg of protein. The activity of PNILDH increased as a function of mycelial mass up to 36 hours of growth while the specific activity reached a value of 90 to 100mU/mg of protein in the first 12 hours, remaining constant for 60 hours.

Induction of PNILDH synthesis in resting cells - Figure 2 illustrates the time course of induction of PNILDH synthesis when fasted glucose grown cells were suspended in a minimal medium containing 1% lactate. After lactate addition, the specific activity increased to a maximum value (90mU/mg protein) in 4 hours. The specific activity (3mU/mg of protein) remained constant during all experiments when fasting attain a final concentration of 1% of carbon source. Growth was carried out at 28°C in batches of 600ml of medium in 2 liter Erlenmeyer flasks on a rotatory shaker (100rpm). Mycelia were harvested by filtration at mid log phase (46h) and washed twice with distilled water at 28°C and used immediately for the enzyme activity determinations or for resting cells experiments. Yields of mycelia were usually about 10g of wet weight per liter of medium.

Induction of PNILDH - Induction experiments were carried out with 5 to 6g of wet weight of mycelia pregrown on glucose, which was suspended in 600ml of minimal medium, without a carbon source, and kept 15 hours at 28°C on a rotatory shaker (100rpm). After this time 1% sodium lactate was added (zero time) and the experiment continued for a further 10 hours.

Table 1 - Effect of carbon sources on the induction of PNILDH in growing cells of *Dactylium dendroides*^a. Symbols: a = Mycelia were grown for 48 hours in liquid minimal medium with 1% of substrate, and the enzyme activities in cell free extracts was determined as described in the text

Growth substrate	Specific activity of PNILDH (mU/mg of protein)
Ethanol	4
Glucose	3
Glycerol	2
Lactate	150
Pyruvate	11

Figure 1 - Induction of PNILDH in growing cells. Symbols: The enzyme activities are expressed as $(E_t - E_0)/M_o$ where E_t and E_0 are the enzyme activity of 1ml extract at time t and 0, respectively. Cell growth is expressed in relative increment M_t/M_o where M_t and M_o are the mg dry weight per ml of culture at times t and 0, 1% lactate was added at zero time as carbon source. (\bullet) = AE/M_o ; (\circ) = specific activity

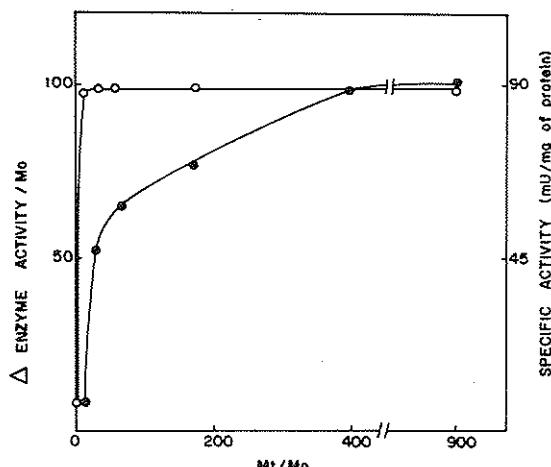


Table 2 - Effect of different carbon sources on PNILDH synthesis induced by lactate in resting cells of *Dactylium dendroides*^a.

Symbols: a = *Dactylium dendroides* was pregrown on glucose for 48 hours and induced with 1% lactate or lactate plus 1% of the indicated carbon sources as described in the text. Four hours after addition of substrates, samples were removed and enzyme activities determined

Carbon source	Specific activity of PNILDH (mU/mg of protein)
Lactate	113
Lactate + ethanol	36
Lactate + glucose	22
Lactate + glycerol	62
Lactate + pyruvate	67

Preparation of extracts - Fresh mycelial suspensions (250mg of wet mycelia in 1.5ml of 0.1M imidazole-HCl pH 7.0) were disrupted by vigorous shaking in a Vortex mixer with 3.0g of glass beads (0.5mm diameter) for a 1 minute period followed cooling in ice for 1 minute. This procedure was repeated five times. The suspensions were carefully removed by suction and centrifuged at 25.000g for 10 minutes in a refrigerated centrifuge. The supernatants were used for enzyme assays.

Enzyme assay - Pyridine nucleotide independent L-lactate dehydrogenase activity was measured as previously described (6) using the following reaction mixture: 80mM imidazole-HCl (pH 6.7); 4 μ moles DCIP, 12 μ moles sodium L-lactate, and a suitable enzyme dilution in a final volume of 1.0ml. One unit of PNILDH was defined as the amount of enzyme which causes the oxidation of 1.0 μ mol of lactate per minute, conditions maintained. Dry weight determination showed that no appreciable mycelial growth occurred during the experiments. The generation time on lactate is 10 hours.

In the presence of cycloheximide, a known inhibitor of protein synthesis in eukaryotes (20), the induction was fully inhibited or abruptly halted (Fig. 2) indicating that the induction of PNILDH requires "de novo" synthesis not an activation of preexisting enzyme.

Effect of glucose and some gluconeogenic carbon sources on the synthesis of PNILDH by lactate - It is known that in several systems glucose is the main effector of catabolite repression (17). Table 2 shows the effect of glucose and some gluconeogenic carbon sources on the synthesis of PNILDH during its induction by lactate.

This decrease in specific activity suggests that some carbon sources have a repressive effect and that glucose was the most effective one.

The glucose addition to a fully induced cell culture promoted both a repression and a dilution of enzyme by successive growth in the first generation as can be seen in Figure 3. In the second generation the decrease in specific activity of PNILDH

was greater than that predicted by the increase of mycelial mass. Without glucose addition the specific activity of PNILDH remained constant for 18 hours.

To ascertain that PNILDH synthesis was subject to catabolite repression and to determine whether exogenous cyclic AMP could overcome this repression the induction of PNILDH was carried out in the presence of glucose with or without dibutyryl cyclic AMP addition. Figure 4 illustrates the results obtained. The activity was 10% derepressed in the presence of 1 or 5mM cyclic AMP.

Discussion

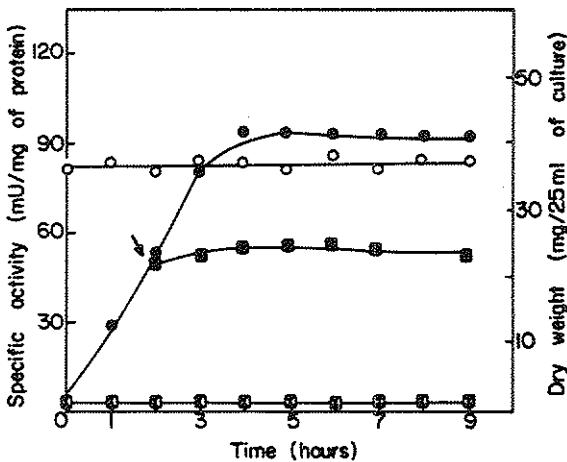
In a previous report (6) we have shown that lactate grown mycelia of *Dactylium dendroides* have high levels of PNILDH but no data was presented concerning the mechanism which relates to the enzyme level under different physiological conditions. Lactate was shown to be the best inducer among the compounds tested (Table 1) the other ones behaved indeed as co-repressors (Table 2). The kinetics of induction experiments performed with growing and resting cells show that the synthesis of PNILDH is switched on, almost immediately after lactate addition allowing the mold to grow on lactate. The enzyme specific activity was held at a constant level compared to the rest of cellular protein after 36 hours of growth, suggesting a steady state between synthesis and degradation.

The increase in enzymatic activity was prevented by the addition of cycloheximide; therefore, "de novo" synthesis of protein is required for a high level of enzyme activity in the presence of lactate, suggesting that the synthesis of PNILDH proceeds by an induction mechanism.

The phenomenon of specific inhibition of enzyme synthesis in the presence of glucose, called "glucose effect" or "catabolite repression", is widespread among microorganisms (1, 4, 5, 7, 10, 12) and has been known for many years (13, 17). The mechanism of glucose repression in eukaryotic cells is poorly understood (12). In general glucose and other carbohydrates appear to decrease the synthesis of enzymes involved in gluconeogenesis. The effect is to prevent the flow of the carbon moieties from other sources to glucose when the cultures shift from low to high carbohydrates levels. In the present case, the mold grown on lactate accumulates glycogen, suggesting that PNILDH is involved in gluconeogenesis.

The role of cyclic AMP in intracellular regulation in eukaryotic is not clear (3, 5, 7, 21). The partial reversion of glucose repression of PNILDH synthesis by dibutyryl cyclic AMP (Fig. 4) is not significant since a higher nucleotide concentration did not enhance the enzyme synthesis. According to Matsumoto & col. (15) the signals for metabolite repression might not be mediated by cyclic AMP, since this nucleotide could not relieve catabolite repression in *Saccharomyces*

Figure 2 - Effect of cycloheximide on PNILDH synthesis induced by lactate. Symbols: Mycelia maintained in minimal medium without carbon source (-□-); mycelia induced with 1% lactate (-●-); mycelia with 1% lactate and 10 μ g/ml of cycloheximide (-x-); 10 μ g/ml of cycloheximide was added to a culture induced by lactate as indicated by the arrow (-■-); mycelia dry weight (-○-). At indicated times samples were taken and the enzyme activities determined as described in Material and Methods.



cerevisiae even when ^3H cyclic AMP was incorporated into the cells.

The rapid disappearance of PNILDH activity in growing populations after repression of its synthesis can not be attributed only to dilution and suggests that an inactivation process, promoted by glucose, could also be present. This inactivation process is now under investigation.

Figure 3 - Repression of PNILDH synthesis by 1% glucose.

Symbols: The mold was grown on 1% lactate and harvested in mid log phase, the mycelia were resuspended in fresh minimal medium and the suspension was divided in two aliquots; 1% glucose was added to one flask and no glucose was added to another. At indicated times samples were taken and the enzyme activities determined as described in Material and Methods. Levels of PNILDH in the presence of (●) and absence of glucose (□); dry weight in presence of glucose (○); theoretical dilution of specific activity by growth (△)

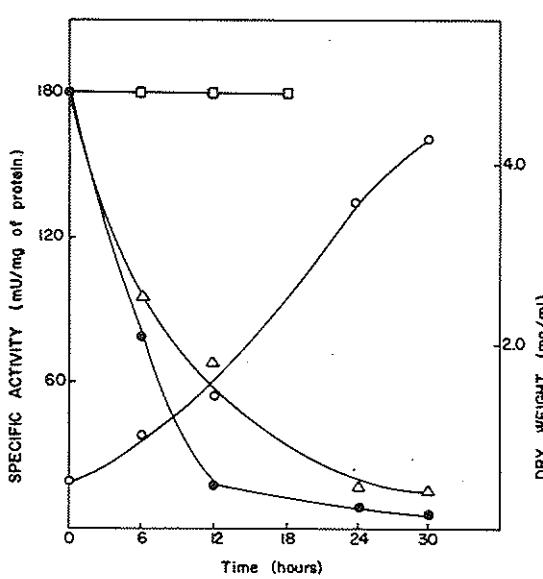
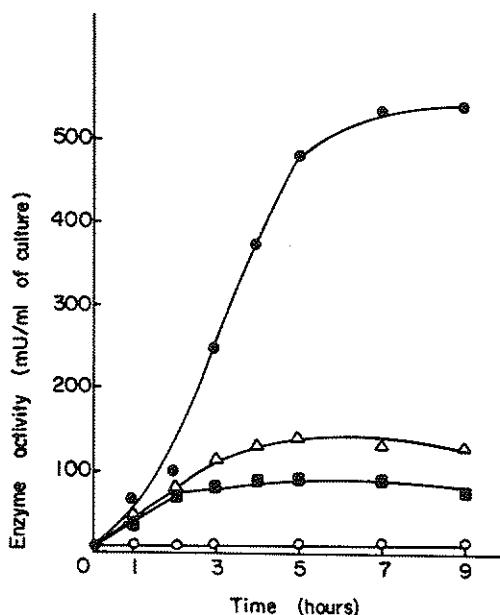


Figure 4 - Effect of dibutyryl cyclic AMP on glucose repression of PNILDH synthesis.

Symbols: Mycelia maintained in minimal medium (○); mycelia induced with 1% lactate (●); mycelia treated with 1% lactate plus 1% glucose (■); mycelia treated with 1% lactate, 1% glucose and 1mM dibutyryl cyclic AMP (△). At indicated times samples were collected and the enzyme activity determined as described in Material and Methods



Acknowledgments

This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). The authors are indebted to Dr. Kasuko Nascimento for her helpful suggestions and critical reading to the manuscript. V.T. was a fellow of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

References

1. Adams, B.G. - Induction of galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae* kinetics of induction and glucose effects. *J. Bacteriol.*, 111:308-315, 1972.

2. Armstrong, J.M.D. - The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenolindophenol. *Biochem. Biophys. Acta*, 86:194-197, 1964.
3. Arst, H.N. & MacDonald, D.W. - A gene cluster in *Aspergillus nidulans* with an internally located cis-acting regulatory region. *Nature*, 254:26-31, 1975.
4. Botsford, J.L. - Cyclic nucleotides in prokaryotes. *Microbiol. Rev.*, 45:620-642, 1981.
5. Chatterjee, S. & Vining, L.C. - Catabolite repression in *Streptomyces venezuelae*: induction of β -galactosidase chloramphenicol production and intracellular cyclic AMP concentrations. *Can. J. Microbiol.*, 28:311-317, 1982.
6. Funayama, S. & Zancan, G.T. - Purification and properties of pyridine nucleotide-independent L-lactate dehydrogenase from *Polyporus circinatus*. *J. Bacteriol.*, 119:1000-1005, 1974.
7. Hodgson, D.A. - Glucose repression of carbon sources uptake and metabolism in *Streptomyces coecolor* A3 (2) its perturbation in mutants resistant to 2 deoxy glucose. *J. Gen. Microbiol.*, 128:2417-2430, 1982.
8. Jayaraman, J.; Cotman, C.; Mahler, M.R. & Sharp, C.V. - Biochemical correlation of respiratory deficiency. VII - Glucose repression. *Arch. Biochem. Biophys.*, 116:224-251, 1966.
9. Klemmleier, C. & Zancan, G.T. - Studies on the taxonomy of a mold producing galactose oxidase. *Arg. Biol. Technol.*, 21:75-85, 1978.
10. Linnane, A.W.; Haslam, J.M.; Lukins, H.B. & Nagley, P. - The biogenesis of mitochondria in microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 26:163-198, 1972.
11. Lowry, O.H.; Rosebrough, N.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
12. MacQuillan, A.M. & Halvorson, H.O. - Metabolic control of β -glucosidase synthesis in yeast. *J. Bacteriol.*, 84:23-30, 1962.
13. Magasanik, B. - Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 26:249-256, 1961.
14. Markus, Z.; Miller, G. & Avigad, G. - Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. *Appl. Microbiol.*, 13:686-693, 1961.
15. Matsumoto, K.; Uno, I.; Toh, E.A.; Ishikawa, T. & Oshima, Y. - Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence from mutants capable of utilizing it as adenine source. *J. Bacteriol.*, 150:277-285, 1982.
16. Nygaard, A.P. - Lactate dehydrogenase of yeast. In: - Boyer, P.D.; Lardy, H. & Myrbäck, K., eds. - *The enzymes*. New York, Academic Press, vol.7, p.557-565, 1963.
17. Paigen, K. & Willians, B. - Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization. *Adv. Microbiol. Physiol.*, 4:251-324, 1970.
18. Pastan, I. & Adhya, S. - Cyclic adenosine 5' monophosphate in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.*, 45:620-642, 1976.
19. Pritchard, G.G. - An NAD⁺-independent L-lactate dehydrogenase from *Rhizopus oryzae*. *Biochem. Biophys. Acta*, 250:25-33, 1971.
20. Siegel, M.R. & Sisler, H.D. - Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. I - Effect of the antibiotic on cellular metabolism. *Biochem. Biophys. Acta*, 87:70-82, 1964.
21. Singh, B.; Gutptaroy, B.; Hasan, G. & Datta, A. - Inhibitory effect on glucose and adenosine 3', 5' monophosphate on the synthesis of inducible N-acetylglucosamine catabolic enzyme in yeast. *Biochem. Biophys. Acta*, 632:345-353, 1980.
22. Snoswell, A.M. - Stereospecific DPN⁺ independent lactic dehydrogenase of *Lactobacillus arabinosus* 17.5. *Biochem. Biophys. Acta*, 35:574-575, 1959.
23. Snoswell, A.M. - Oxidized nicotinamide adenine dinucleotide independent lactate dehydrogenase of *Lactobacillus arabinosus* 17.5. *Biochem. Biophys. Acta*, 77:7-9, 1963.
24. Walker, H. & Eagon, R.G. - Lactic dehydrogenase of *Pseudomonas natriegens*. *J. Bacteriol.*, 88:25-30, 1964.
25. Yamada, K.; Yamada, H.H.; Takesue, Y. & Tanaka, S. - The presence of two lactic dehydrogenase in *Pericularia oryzae*. *J. Biochem. (Tokyo)*, 50:72-73, 1961.

OCORRÊNCIA DE ESTREPTOCOCOS BETA-HEMOLÍTICOS DOS GRUPOS A
(E SEUS TIPOS T); C E G EM ESCOLARES DE ARARAQUARA SP,
SETEMBRO DE 1979

Clara Pechmann Mendonça

Deptº de Ciências Bio-Clinicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara UNESP
Caixa Postal 331
14800 Araraquara SP, Brasil

Carlos Solé-Vernip

Deptº de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP
Campus de Ribeirão Preto
14100 Ribeirão Preto SP, Brasil

& Maurício Zangrandino Nogueira

Serviço Especial de Saúde de Araraquara SESA
14800 Araraquara SP, Brasil

Resumo

Levantamento de estreptococos beta-hemolíticos, em 534 escolares de 1º grau de Araraquara SP, em material de orofaringe e mucosa nasal. O processamento cultural paulatino requereu o processo especial de enriquecimento. A extração do polissacarídeo C, para grupagem, foi feita pelo processo enzimático e a tipagem T, de *Streptococcus pyogenes*, pelo método de aglutinação. Foram obtidos 94 casos positivos (17,6%) para estreptococos beta-hemolíticos. Das 121 amostras isoladas destes portadores, 96 (79,3%) foram do grupo A, 18 (14,9) do grupo G e 7 (5,8%) do grupo C. 18% dos escolares tiveram cultura positiva para o grupo A, levando-se em consideração a positividade em nariz, garganta ou nariz e garganta e ainda que, de frequentes crianças, isolaram-se amostras de diferentes grupos e mesmos de tipos sorológicos do grupo A. Obtiveram-se 81,2% de amostras do grupo A, sendo que a maior frequência foi de sorotipos do complexo T 3, 13, B3264, seguido de T 12 e T 11. Clinicamente, verificou-se que 25% dos escolares, com cultura positiva para *Streptococcus pyogenes*, revelaram um ou mais dados clínicos. Dentre estes, 8,6% apresentaram ausculta cardíaca patológica e episódios de alguma ou algumas das seguintes sintomatologias: infecções frequentes na orofaringe, nefrite, coreia, dores nas articulações e artrite. Os dados validam o tipo de levantamento como ponto de partida para prevenção de doenças causadas por *Streptococcus pyogenes*.

Summary

The occurrence of groups A (and its T types) C and G of beta-hemolytic streptococci in school children in Araraquara SP, Brazil, September 1979

Rev. Microbiol. São Paulo, 14(4):265-272, Out./Dez. 1983.

Prevalence of beta-hemolytic streptococci in the throats and nose (vestibular area) of 534 normal school-children in Araraquara SP, Brazil. For a planned gradual culture processing, a special procedure was adapted. Among the children, 94 (17.6%) were positive for beta hemolytic streptococci. Out of 121 strains obtained, 96 (79.3%) were group A; 18 (14.9%) group G and 7 (5.8%) group C. 18% of the children had positive culture for group A either in the throat or in the nose or in both regions. 81.2% from the 96 group A strain were typable, the most frequent serological types pertaining to the complex T 3, 13B3264; T 12 and T 11 being next. 25% of the children with positive *Streptococcus pyogenes* cultures had one or more clinical symptoms. 8.6% of this group showed a pathologic cardiac beat plus reference to one or more episodes of the following symptomatology: frequent throat infection, nephritis, chorea, pains at joints, and arthritis. This kind of research is useful as a starting point, for the prevention of diseases caused by *Streptococcus pyogenes*.

Introdução

A prevalência das infecções estreptocócicas tem sido bastante elevada em quase todas as partes do mundo, mesmo em países considerados desenvolvidos (10).

Pesquisadores do mundo inteiro relatam a incidência de suas sequelas: a doença reumática (DR), assim como a glomerulonefrite pós-estreptocócica (8, 17, 23, 29). É aceito, e já confirmado por numerosos estudos clínicos, epidemiológicos e bacteriológicos, o fato de que, para ocorrer a DR ou a glomerulonefrite difusa aguda, é necessário que haja, antes, infecção por *Streptococcus pyogenes* (1, 15, 21, 27, 30, 31).

Por muito tempo a DR foi considerada doença de clima temperado. Hoje, constitui sério problema de saúde, em países tropicais e sub-tropicais (17). Não menos intensa tem sido a frequência da glomerulonefrite, especialmente relacionada com o nível sócio-econômico baixo (19, 35, 36), quando precedida de piôdermite (impetigo).

Entre nós, numerosos trabalhos relatam desde 1937, a ocorrência da DR e da glomerulonefrite em surtos, às vezes epidêmicos, embora, diante de outras patologias, não constitua um problema de saúde pública (3, 6, 7, 12, 22, 26, 33, 34).

Em 1957, foi demonstrada a importância da verificação da presença de estreptococos beta-hemolíticos do grupo A em escolares normais do Rio de Janeiro (29). Outras investigações, em portadores saudáveis, mostram a alta incidência deste microrganismo no Brasil (1, 4, 16, 24, 27), confirmando o valor deste achado epidemiológico nas complicações não supurativas das infecções estreptocócicas.

O objetivo deste estudo foi verificar a natural ocorrência dos grupos de estreptococos beta-hemolíticos A, C e G, e dos tipos de estreptococos do grupo A que mais prevalecem numa população escolar, considerada normal na época da coleta do material (sem preocupação com o fato de terem sido ou não amídalectomizados), assim como tentar relacionar o achado com algum problema de saúde, encontrado após exame clínico.

Casuística e Métodos

População estudada - 534 escolares, de 6 a 15 anos, da Escola Estadual do 1º grau "Prof. Augusto da Silva Cezar", localizado no Bairro São José, em Araraquara SP, foram estudados através de: a) anamnese; b) exame clínico e c) exames bacteriológicos da orofaringe e mucosa nasal, para pesquisa de estreptococos beta-hemolíticos.

Foi preparada uma ficha constando: identificação do escolar, antecedentes pessoais e familiais, além de algumas perguntas específicas sobre o assunto em estudo (25).

Exame clínico - Realizado em 459 escolares e que constou de vários ítems: peso, altura, frequência e ausculta cardíaca, tomada de pressão arterial, verificação de nódulos sub-cutâneos, estado da orofaringe e também o estado de conservação dos dentes.

A pressão arterial foi tomada em posição sentada, braço esquerdo, com tensiómetro tipo Tycos, numa só ocasião.

O peso e altura foram medidos em balança Filizola antropométrica. Em relação ao peso, para comparar os resultados obtidos com os esperados, aplicou-se a fórmula: Peso = $n \cdot 2 + 9$, onde n é o número de anos do escolar, obtendo-se o peso médio ideal dos 6 aos 12 anos. Da mesma maneira, aplicou-se a fórmula: Altura = $(n-3) \cdot 6 + 95$, obtendo-se a altura média dos 6 aos 12 anos (19).

Colheita das amostras - A fim de obter o material de todos os escolares, no mais curto prazo e sem ser possível processar a todas as culturas dentro do período de horas, recomendado após a coleta, adotou-se a técnica que segue: imediatamente após a coleta, feita com zaragatoa, umedecida em solução fisiológica estéril (37), fez-se o plantio em meio de Hitchens-Pike-Todd-Hewitt ou HPTH (28), retirando-se, tanto quanto possível, todo material, pela agitação ampla da zaragatoa no meio e comprimindo-se, finalmente, o algodão de encontro à parede interna do tubo. A seguir, os tubos foram conservados a 4°C (geladeira), de onde eram retirados, para processamento da cultura, apenas em número proporcional ao dia de trabalho. Desse modo, foram coletados 1068 materiais, em apenas três dias (no mês de setembro de 1979), mas seu processamento por cultura se estendeu por 45 dias.

Métodos bacteriológicos - A cada dia, retirava-se, da geladeira, um certo número de tubos para cultura, só então juntava-se, a cada um deles, 4% de sangue desfibrinado de carneiro e, após uma primeira homogeneização, no "mixer", eram incubados a 37°C.

A preferência pelo uso do sangue de carneiro foi ditada pela facilidade de sua obtenção, já que tem sido recomendado para este tipo de investigação (5, 35). Após 6-8 horas de incubação, os tubos foram novamente homogeneizados (29) e, voltando à incubação, até completarem as 24 horas, quando, após a terceira homogeneização se fizeram repiques para placas em superfície de ágar-sangue de carneiro, cuja base foi o infuso de coração bovino.

A caracterização morfológica e de grupamento foi verificada pela coloração de Gram; a identificação do tipo de hemólise foi baseada na leitura da placa ao microscópio, com pequeno aumento (32). De cada cultura, de material de nariz e garganta, foram isoladas colônias beta-hemolíticas, de aspectos aparentemente diferentes.

As amostras de estreptococos beta-hemolíticos foram preservados em sangue desfibrinado de coelho (28). Antes, porém, realizou-se o diagnóstico presuntivo de estreptococos do grupo A, através da prova da bacitracina (14), com discos comerciais fornecidos pelo Centro de Controle e Produtos para Diagnóstico, SP (Cecon).

Métodos sorológicos - A grupagem, assim como a tipagem de *Streptococcus pyogenes*, foram realizadas no Laboratório de *Streptococcus*, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP. A extração do polissacarídio C de estreptococo, para grupagem, foi realizada pelo processo de Maxted (13), seguida de reação com soros precipitantes dos grupos A, C e G de Lancefield.

Para tipagem pelas proteínas T, utilizou-se o método de aglutinação de Griffith, modificado por Moody & col. (15), que excluíram cinco soros monovalentes 15, 17, 47 (do "pool" Y) 19 e 30 (do "pool" Z). Nossas amostras foram testadas, excluindo, ainda, os soros 5, 27 e 44 (do "pool" W) sendo, portanto, testadas com os restantes 18 soros, a saber: 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 18, 22, 23, 25, 28, Imp.19 e B3264.

Os soros para grupagem e para tipagem de estreptococos do grupo A foram preparados e avaliados no Laboratório de Ribeirão Preto. Os soros para tipagem T foram avaliados, também, no CDC (Atlanta, GA), por especial obséquio do Dr. Richard R. Facklam.

Os vários ítems do protocolo foram preenchidos separadamente pelos AA, sem que um tivesse conhecimento dos resultados dos demais. Somente no final do trabalho expe-

rimental é que as informações foram registradas e cotejadas, num mesmo conjunto.

Resultados

Considerando-se, em primeiro lugar, os resultados, em relação à presença ou ausência de estreptococos beta-hemolíticos, verificou-se que, dentre os 534 escolares examinados, 440 (82,4%) foram negativos e 94 (17,6%) positivos.

As amostras isoladas foram assim obtidas: de 67 (73,4%) escolares, positividade a partir só de material de garganta; de 12 (10,6%), a partir só de nariz; e de 15 (16%), de nariz e de garganta, com isolamento total de 121 amostras de estreptococos beta-hemolíticos. Destas amostras, 96 (79,3%) pertencem ao grupo A, 18 (14,9) ao grupo G e 7 (5,8%) ao grupo C (Tabela 1). A diferença, entre o número de escolares portadores de estreptococos beta-hemolíticos (94) e o número de amostras obtidas (121), deve-se ao fato de que alguns escolares eram portadores de mais de um grupo sorológico ou mesmo de tipos sorológicos do grupo A, no nariz, garganta, ou nariz e garganta. Assim, obteve-se na garganta de três escolares, amostras do grupo A e G; em um, A e C; em um, grupo A e G, no nariz; seis escolares, isolaram-se, na garganta amostras de dois tipos sorológicos, do grupo A (T 11 e T 3/13/B3264 - T 11 e T 12 - T Imp. 19 e T 3/13/B3264 - NT e T 13/B3264 - T 12 e T 3/13/B3264 - T 4 e T 12); e, em um, os mesmos dois tipos (T 12 e T 8/25/Imp. 19), presentes, tanto no nariz como na garganta.

Não houve, portanto, amostras beta-hemolíticas não grupáveis pelos soros A, C e G. Na Tabela 2, estão distribuídos os grupos sorológicos dos estreptococos beta-hemolíticos, de acordo com a série frequentada pelo escolar.

O cotejamento do diagnóstico de estreptococos, do grupo A, pela prova sorológica e com o da sensibilidade à bacitracina, forneceu os seguintes resultados: 1% das amostras sensíveis à bacitracina não precipitou o soro específico do grupo A (falso positivo à bacitracina) e 2,1% das amostras que precipitaram com este soro foi resistente à bacitracina (falso negativo à bacitracina).

A tipagem das proteínas T forneceu 96 sorotipos ou melhor, modelos "patterns", como freqüentemente acontece, distribuídos de acordo com a Tabela 3. Houve maior freqüência de amostras de sorotipo do complexo T 3, 13, B3264 (29,2%), seguidos do sorotipo T 12 (17,7%) e do T 11 (9,4%). Obtiveram-se 81,2% de amostras tipáveis. Todas as amostras não tipáveis o foram por se apresentarem com rugosidade irredutível.

Embora quase todos os escolares tivessem sido submetidos ao exame clínico, foram considerados apenas os resultados dos portadores de estreptococos beta-hemolíticos (92 escolares examinados). A Tabela 4 refere-se à medida aritmética do peso, altura, pressão arterial e freqüência cardíaca. A Tabela 5 registra o estado normal ou patológico de ausculta cardíaca, dentes, orofaringe e nódulos subcutâneos.

Dada a dificuldade de obtenção de algumas respostas ao questionário específico,

Tabela 1 - Procedência do material e grupos sorológicos de 121 amostras de Estreptococos beta-hemolíticos obtidos de 94 portadores. Araraquara SP, 1979.
Símbolos: N = nariz; G = garganta; * = vide texto (Resultados)

Grupos sorológicos	Material					Amostras	
	N	G	N e G	Total	a		
A	11	59	13	96	79,3		
C	0	5	2	7	5,8		
G	2	12	4	18	14,9		
Total de amostras	13	76	32	121	100,0		
Total de portadores*	12	67	15	94			

Tabela 2 - Distribuição de nº de amostras de estreptococos beta-hemolíticos segundo os grupos sorológicos A, C e G de acordo com a série frequentada pelo escolar. Araraquara SP, 1979.
Símbolos: a = amostras; p = portadores

Grupo sorológico	Série							
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	7 ^a	8 ^a
a	p	a	p	a	p	a	p	a
A	65	45	11	9	10	10	4	3
C	1	1	5	4	0	0	0	0
G	9	7	2	2	3	3	0	0
Total	75	18	13	4	6	2	1	3
Portadores	53	15	13	3	4	1	1	3

deixou-se de apreciar seus resultados, registrando-se apenas que, dentre os portadores de estreptococos beta-hemolíticos, houve casos confirmados de nefrite e de coreia; vários desses menores queixavam-se, também, de dores articulares.

Discussão

Dos 534 escolares, 17,6% eram portadores de estreptococos beta-hemolíticos. Considerando os 534 escolares examinados e lembrando-se de que de alguns isolaram-se amostras de mais de um grupo e mesmo de tipos sorológicos diferentes do grupo A (Tabela 1), obteve-se positividade de 18% para o grupo A; 3,4% para o grupo G e 1,3% para o grupo C. Estes dados não diferem muito dos obtidos por outros autores (1, 2, 9, 20), embora trabalhando em regiões, às vezes, de condições bem diferenciadas, população de 330 escolares (27), considerados normais, residentes na zona rural de Ribeirão Preto SP, 75 (23%) eram portadores do grupo A; 28 (9%) do grupo C e 26 (8%) do grupo G. Entre 67 pessoas de zona rural, examinadas após 4 semanas da ocorrência de casos de glomerulonefrite aguda (3), 61% eram portadores de estreptococos beta-hemolíticos na orofaringe, tendo sido isoladas 21 amostras do grupo A, 7 do grupo C, 3 do grupo G e 12 amostras de outros grupos. Em Fortaleza, CE, entre universitários, foi encontrado 11% de portadores do grupo A (16).

Entre os escolares que frequentavam a 1ª série do 1º grau (Tabela 2) houve prevalência mais acentuada de portadores de estreptococos beta-hemolíticos. Dos 104 escolares desta série, 53 (50,9%) apresentaram-se como portadores, isolando-se 75 (61,9%) amostras. Portanto, encontrou-se 9,9% de portadores, entre os 534 escolares estudados e 56,4%, dentre os 94 portadores de estreptococos beta-hemolíticos.

Da 2ª a 8ª série inicia-se uma queda bem acentuada da presença de estreptococos beta-hemolíticos. Num total de 430 escolares, 41 (9,5%) apresentaram-se como portadores, isolando-se 46 (38,1%) amostras, representando 43,6% portadores dentre os 94 e 7,7% dentre o total dos escolares examinados, ou seja 534. Notou-se que a diminuição incidiu nitidamente no grupo A; houve aumento de portadores do grupo C na 2ª série e seu desaparecimento nas séries subsequentes e prevalência de portadores do grupo G em quase todas as séries.

Em trabalho realizado com 434 escolares (20), observou-se queda da prevalência de estreptococos, entre os frequentadores de classes mais avançadas e também de mais idade. Este fato também foi observado em relação a DR (11).

Clinicamente, também foi verificado (Tabela 5) que, entre 6 e 11 anos de idade, houve maior número de casos com ausculta cardíaca anormal (sopros sistólicos de meso ou de ponta), assim como, entre 6 e 9 anos, número maior de casos com hipertrofia das amígdalas ou de gânglios.

Considerando-se todos os 459 escolares examinados e analisando-se os resultados pela média aritmética, verificou-se que não houve uma variação que pudesse ser considerada significativa entre portadores e não portadores de estreptococos beta-hemolíticos.

Tabela 3 - Sorotipos de 96 amostras de *Streptococcus pyogenes* isolados de 534 escolares de Araraquara SP, 1979

Sorotipos T	Nº amostras	%
3/13/B3264	17	
3/13/B3264/12	1	
3/13/B3264/9	3	28
13/B3264	1	
B3264	6	
12	17	17,7
11	9	9,4
28/14	2	
28	5	7,3
14(49)	5	5,2
4	5	5,2
8/25/Imp. 19	2	
Imp. 19	2	4,2
9	1	1,0
6	1	1,0
13	1	1,0
NR	18	18,8
Total	96	100,0

Tabela 4 - Médias aritméticas do peso, altura, pressão arterial e frequência cardíaca de 92 escolares, portadores de estreptococos beta-hemolíticos, segundo o grupo etário, Araraquara SP, 1979

Idade	Esco- lares	Peso (kg)	Altura (cm)	P. arterial		
				Sistó- lica	Diastó- lica	FC
6	3	24,0	115,8	90,0	66,7	94,0
7	26	24,2	112,6	98,5	65,0	90,0
8	20	29,0	133,2	107,0	74,0	94,2
9	12	27,5	130,3	98,3	66,7	88,0
10	11	32,7	133,0	105,5	70,9	85,3
11	12	35,5	139,9	103,3	70,0	84,7
12	1	65,2	149,0	140,0	80,0	92,0
13	1	45,8	155,0	110,0	90,0	88,0
14	5	49,9	156,5	124,0	82,0	67,2
15	1	30,6	141,0	100,0	70,0	72,0

Porém, levando-se em consideração que neste trabalho não se tentou separar portadores saídos de pacientes, denominando-os de um modo geral de portadores, observou-se que 25% destes, todos com *Streptococcus pyogenes*, revelaram um ou mais dados clínicos, como hipertrofia das amígdalas, presença de gânglios hipertrófiados e frequência cardíaca alterada. Entre esses menores, 8,6% revelaram ausculta cardíaca patológica, coincidindo com relatos do questionário sobre infecções frequentes da orofaringe, nefrite, corea, dores e mesmo franca inflamação das articulações.

Não foi propósito deste trabalho o estudo de sequelas não piogênicas das estreptococias. Confirma-se, entretanto, a susceptibilidade das crianças mais jovens às infecções estreptocócicas, sem manifestações de sintomatologia de DR evidentes, à época em que foram examinadas.

Considerando a prevalência de portadores e os dados clínicos sugestivos, obtidos nesta investigação, pode-se aceitar como importante e viável a pesquisa de estreptococos beta-hemolíticos em escolares, partindo-se, daí, para uma profilaxia racional das enfermidades causadas por este microrganismo.

Tabela 5 - Dados do exame clínico de 92 escolares portadores de estreptococos beta-hemolíticos, de acordo com o grupo etário, Araraquara SP, 1979.

Símbolos: N = Normal; P = Patológico; H = Hipertrófico (a); T = Tratado; NT = Não Tratado

Idade	Nº escolares	Escolares com								
		ausculta cardíaca		gânglios		amígdalas		dentes		
		N	P	N	H	N	H	N	H	NT
6	3	3	0	2	1	2	1	2	1	1
7	26	22	4	20	6	17	9	14	12	
8	20	20	0	15	5	16	4	13	7	
9	12	10	2	7	5	9	3	9	3	
10	11	11	0	9	2	8	3	11	0	
11	12	10	2	11	1	7	5	12	0	
12	1	1	0	1	0	1	0	1	0	
13	1	1	0	1	0	1	0	1	0	
14	5	5	0	4	1	5	0	5	0	
15	1	1	0	1	0	1	0	1	0	
Total	92	84	8	71	21	67	25	69	23	

Agradecimentos

À Direção da Escola Estadual do 1º Grau "Prof. Augusto da Silva Cesar; às farmacêuticas, então estagiárias na disciplina de Microbiologia: Gisela Aparecida Marsari, Maximina do Céu Fernandes Mogadouro, Arlete de Lourdes Messi e Maria do Carmo Bratfich; assim como a todos aqueles que cooperaram para a execução deste trabalho.

Referências Bibliográficas

- Castro, H.S. - Dados de um inquérito sobre ocorrência de estreptococos em crianças normais e doentes no Rio de Janeiro. An. Microbiol., 9:329-351, 1961.
- Chen, S.C.; Dugdale, A.E. & Puthucheary, S.D. - Beta hemolytic streptococcal carriers among school children. Trop. Georg. Med., 24:257-259, 1972.
- Favero, M.; Nogueira, J.L.; Solé-Vernin, C. & Souza, S.L. - Surto de glomerulonefrite difusa aguda em comunidade rural. Hospital, 72:1189-1202, 1967.
- Fracalanza, S.E.L. & Benchetrit, L.C. - Distribution of beta hemolytic streptococci in pharyngeal specimens of normal children in Araraquara SP, Brazil. Rev. Microbiol., 12:154-157, 1981.
- Finegold, S.M.; Martin, W.J. & Scott, E.G. - Bailey and Scott's diagnostic microbiology. 5.ed. Saint Louis, Mosby, p.58-60, 130-137, 1978.
- Glezer, M. - Simpósio sobre doença reumática. I - Epidemiologia II. Ars Curandi Cardiol., 3:32-36, 1981.
- Goés, P. & Suassuna, I. - Fundamentos e síntese dos dados recolhidos em um inquérito sobre as infecções estreptocócicas na infância no Rio de Janeiro. An. Microbiol., 9:287-290, 1961.
- Hewitt, D. & Stewart, A. - Some epidemiological aspects of acute rheumatism. Br. J. Med., 6:161-163, 1952.
- Holmes, M.C. & Willians, R.E.O. - The distribution of carriers of *Streptococcus pyogenes* among 2,413 healthy children. J. Hyg., 52:165-179, 1954.

10. Kreling, P.A.; Gregori Jr., F.; Ribeiro, I.A.; Façanha, L.A.; Canesin, O.; Peixoto, R.S. & Silva, S.S. - Algumas características no estudo do Estreptococos, na fase aguda da doença reumática, em nosso meio. *Rev. Assoc. Med. Brasil.*, 24:391-394, 1978.
11. Laurenti, R. - Simpósio sobre doença reumática. I - Epidemiologia I. *Ars Curandi Cardiol.*, 3:28-32, 1981.
12. Martini, A.S.; Solé-Vernin, C. & Silva, E.M.C. - Aspectos bacteriológicos, e epidemiológicos na glomerulonefrite difusa aguda (pós estreptocócica) de casos esporádicos em Londrina PR. *Rev. Microbiol.*, 9:62-70, 1978.
13. Maxted, W.R. - Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping. *Lancet*, 14:255-256, 1948.
14. Maxted, W.R. - The use of bacitracin for identifying group A streptococci. *J. Clin. Pathol.*, 6:224-226, 1953.
15. Moody, M.D.; Padula, J.; Lizana, D. & Hall, C.T. - Epidemiologic characterization of group A streptococci by T-agglutination and M-precipitation test in the public health laboratory. *Hlth. Lab. Sci.* 2:149-162, 1965.
16. Noronha, M.C.C.; Riedel, O.O. & Souza, T.T. - Grupagem de estreptococos beta-hemolítico e tipagem dos grupos A em Universitários de Fortaleza, Ceará, Brasil. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará*, 15:45-50, 1975.
17. Padvamati, S. - Rheumatic fever and rheumatic heart disease in developing countries. *Bull. WHO*, 56:543-550, 1978.
18. Pernetta, C. - Semiologia infantil. 3.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.31-32, 1965.
19. Potter, E.U.; Svartman, M.; Burt, E.G.; Finklea, J.F. : Ponking, T. & Earle, D.P. - Relationship of acute rheumatic fever to acute glomerulonefritis in Trinidad. *J. Infect. Dis.*, 125:619-625, 1972.
20. Quinn, R.W. & Fenderspiel, C.P. - The occurrence of hemolytic streptococci in school children in Nashville, Tennessee. *Am. J. Epidemiol.*, 97:22-23, 1973.
21. Rachid, A.; Titton, S.A.; Boaretti, A.C.I.; Wertman, L & De Paola, D. - Doenças difusas do tecido conjuntivo. 2.ed. Rio de Janeiro, Schering, p.152, 1972.
22. Ramos, A.C. & Oliveira, A.S. - Aspectos profiláticos da febre reumática. *Med. Hoje*, 27:348-350, 1977.
23. Shiokama, Y. - Past, present and future of rheumatic fever and rheumatic heart disease in Japan. *Jpn. Circul. J.*, 37:171-176, 1973.
24. Schmid, A.W.; Wilson, D.; Iaria, S.T.; Costa, F.D.; Feher, J.; Borges, D.R.; Santos, R.D. & Godoy, J.M. - Estudos sobre estreptococos em habitantes de duas vilas do Território de Amapá, em 1963. *Rev. Paul. Med.*, 65:58-60, 1964.
25. Silva, W.N.; Sawaya, N. & Silva, E.P.C. - Epidemiologia da doença reumática do coração: um estudo sobre frequência de cardiopatia em escolares de 7 a 14 anos no município de S. Paulo. *Ar. Bras. Cardiol.*, 22:235-242, 1969.
26. Siqueira, L.C. & Oliveira, A.S. - Frequência sintomatológica na febre reumática em 1.000 pacientes entre 4 a 15 anos de idade. *Bol. Inst. Puer. Univ. Brasil*, 22:99-102, 1965.
27. Solé-Vernin, C. - Groups A, C and G streptococci and antiestreptolysin O serum level from health rural school-children of Ribeirão Preto SP, Brasil. *Hospital*, 66:331-348, 1964.
28. Solé-Vernin, C. - *Streptococcus pyogenes* carriers detection: Preservation of original throat specimens and their enrichment. *Hospital*, 65:765-784, 1964.
29. Solé-Vernin, C. & Castro, H.S. - Estudo sobre os estreptococos. IV - Ocorrência de estreptococos do grupo A em crianças normais do Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, 5:181-194, 1957.
30. Stollerman, G.H. - Factors determining the attack rate of rheumatic fever. *Jama*, 177:823-828, 1961.
31. Stollerman, G.H.; Lewis, A.J.; Schutz, I. & Taranta, A. - Relationship of immune response of group A streptococci to the course of acute chronic and recurrent fever. *Am. J. Med.*, 20:163, 1956.
32. Taranta, A. & Mook, M.D. - Diagnosis of streptococcal pharyngitis and rheumatic fever. *Pediat. Clin. N. Am.*, 18:125-129, 1963.
33. Telles, W. - Considerações clínicas sobre os estreptococos e a febre reumática: principais aspectos do problema no Brasil. *An. Microbiol.*, 9:291-328, 1961.

34. Toporovsky, J. - Aspectos bacteriológicos e imunológicos da glomerulonefrite difusa aguda (pós-estreptocócica) na infância, SP. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 1975. (Tese de Livre Docência).
35. Wannamaker, L.W. - A method for culturing beta hemolytic streptococci from the throat. *Circulation*, 32:1054-1058, 1965.
36. Wannamaker, L.W. - Differences between streptococcal infections of the throat and of the skin. *N. Engl. J. Ned.*, 282:23-31, 1970.
37. Williams, R.E.O. - Laboratory diagnosis of streptococcal infections. *Bull. WHO*, 19:153-176, 1958.

SENSIBILIDADE IN VITRO DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* A SEIS DROGAS ANTIMICROBIANAS

Heriberto Fernández
Laura Otth

Instituto de Microbiología Clínica
Universidad Austral de Chile
Casilla 567
Valdivia Chile

& Mariella Bittner

Escuela de Tecnología Médica
Universidad Austral de Chile

Resumo

A sensibilidade in vitro, de 50 amostras de *Neisseria gonorrhoeae*, frente a 6 drogas antimicrobianas foi estudada através do método de diluição em meio sólido descrito por Robson & Salit. De acordo com a CI90%, as drogas mais ativas foram ampicilina, rifampicina, amoxacilina e penicilina, seguidas de eritromicina e tetraciclina que apresentaram CI90% de 1,17 e 2,5 μ g/ml, respectivamente. Parte das amostras pesquisadas apresentou resistência relativa a todos os antibióticos utilizados.

Summary

In vitro susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to six antimicrobial drugs

The in vitro susceptibility of 50 strains of *Neisseria gonorrhoeae* to six antimicrobial drugs was established, using the method of Robson & Salit. The most active drugs were ampicillin, rifampicin, amoxycillin and penicillin, followed by erythromycin and tetracycline, which showed CI90% of 1,17 and 2,5 μ g/ml respectively. Relative resistance was found for all the drugs tested.

Introdução

As infecções gonocócicas constituem, em conjunto, problema atual e importante em saúde pública, bem como motivo de constante preocupação das autoridades sanitárias (1).

Nos últimos anos, vários estudos, para determinar a sensibilidade in vitro de *Neisseria gonorrhoeae*, revelaram que em algumas regiões, a resistência, a certos antibióticos, tende a aumentar (5), enquanto em outras ocorre o fenômeno contrário (2, 3, 5).

As diferenças regionais requerem, por motivos terapêuticos e epidemiológicos a determinação dos padrões de sensibilidade de *N. gonorrhoeae* em diferentes partes do mundo.

Neste trabalho, é relatada a sensibilidade in vitro de 50 amostras de *N. gonorrhoeae*.

eae isoladas na cidade de Valdivia, Chile, a seis drogas antimicrobianas.

Material e Métodos

Amostras - Das 50 amostras de *N. gonorrhoeae*, 27 foram isoladas de mulheres (secreção endocervical) e 23 de homens (secreção uretral). O isolamento foi feito em meio Thayer-Martin e a identificação pela morfologia típica (Gram), reação de oxidase positiva e provas de fermentação de carboidratos (1).

Teste de sensibilidade - As concentrações inibitórias mínimas (CIM) de penicilina (Wyeth), tetraciclina (Lederle), rifampicina (Lepetit), eritromicina (Eli-Lily), ampicilina e amoxacilina (Beecham), para as amostras estudadas, foram determinadas pelo método de diluição em meio sólido (7).

Os antibióticos foram utilizados nas concentrações de 0,025 a 2U/ml, para penicilina, 0,025 a 4 μ g/ml para tetraciclina e 0,025 a 2 μ g/ml para os demais antibióticos. A CIM foi definida como a menor concentração do antibiótico, capaz de inibir completamente o crescimento macroscópico das amostras estudadas.

Foram definidas como amostras de menor sensibilidade, ou com resistência relativa, aquelas que apresentaram CIM para: penicilina >0,5U/ml, tetraciclina e eritromicina >1 μ g/ml, rifampicina >1,25 μ g/ml e para ampicilina e amoxacilina >0,16 μ g/ml (2, 9).

Tabela 1 - Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de 6 antibióticos frente a *N. gonorrhoeae*.

Símbolos: *CIM = para penicilina expressa em U/ml, para todos os outros antibióticos em μ g/ml; () = percentagem acumulativa; CI50%, CI90% = concentração inibitória necessária para inibir, respectivamente, 50 e 90% das amostras estudadas

Droga antimicrobiana	Total	Nº & de amostras segundo CIM*										CI50%	CI90%							
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%									
Penicilina	50	100	-	-	3	6	9	18	31	62	6	12	1	2	-	-	-	0,26	0,7	
					(6)	(24)	(24)	(48)	(86)	(98)	(98)	(100)								
Tetraciclina	50	100	-	-	-	-	1	2	13	26	15	30	12	24	8	16	1	2	0,87	2,5
							(2)	(28)	(28)	(58)	(58)	(82)	(82)	(98)	(98)	(100)				
Rifampicina	50	100	-	-	-	-	21	42	28	56	-	-	1	2	-	-	-	-	0,16	0,38
							(42)	(98)	(98)	(100)										
Eritromicina	50	100	-	-	1	2	10	20	19	38	14	28	6	12	-	-	-	-	0,4	1,17
					(2)	(22)	(22)	(60)	(60)	(88)	(88)	(100)								
Ampicilina	50	100	1	2	4	8	34	68	9	18	1	2	1	2	-	-	-	-	0,082	0,36
			(2)	(10)	(78)	(78)	(96)	(96)	(98)	(100)										
Amoxacilina	50	100	-	-	3	6	24	48	18	36	4	8	1	2	-	-	-	-	0,095	0,5
					(6)	(54)	(90)	(98)	(98)	(100)										

Resultados

Na Tabela 1, verifica-se que 86% das amostras foram inibidos por 0,5U/ml de penicilina enquanto que 58% o foi pela concentração de 1 μ g/ml de tetraciclina; 98% das amostras foram inibidas por concentração igual a 0,5 μ g/ml de rifampicina e 88% com 1 μ g/ml de eritromicina. A concentração de 0,1 μ g/ml de ampicilina e amoxacilina, a inibição foi de 78% e 54%, respectivamente. De acordo com a CI90% (concentração necessária para inibir 90% das amostras estudadas), as drogas mais ativas foram pela ordem: ampicilina, rifampicina, amoxacilina e penicilina, seguidas de eritromicina e tetraciclina, que apresentaram CI90% de 1,17 e 2,5 μ g/ml, respectivamente.

Discussão

Pelo critério de Sparling (9), 14% das amostras, ao serem inibidas por concentração de penicilina, superiores a 0,5U/ml, apresentou o fenômeno de menor sensibilidade ou de resistência relativa. Estes resultados assemelham-se aos do Canadá (7). Quando comparados aos obtidos nos EUU (3), as amostras chilenas de *N. gonorrhoeae* apresentaram resistência à penicilina, mas sensibilidade similar à ampicilina e tetraciclina. A resistência a penicilina também é maior que a encontrada nas amostras estudadas na Inglaterra (8) e na Holanda (10), embora a sensibilidade à rifampicina e tetraciclina, sejam similares às encontradas pelos respectivos autores. Em relação a eritromicina, as amostras chilenas apresentaram menor sensibilidade que as na Bélgica (2, 4) e na Inglaterra (6).

De acordo com os critérios de Gordts & col. (2), para definir as amostras com resistência relativa à ampicilina e amoxacilina ($MIC > 0,16\mu g/ml$), à tetraciclina e eritromicina ($MIC > 1\mu g/ml$) à rifampicina ($MIC > 1,25\mu g/ml$), parte das amostras chilenas apresentaram esta característica, em níveis superiores aos estabelecidos pelos autores mencionados.

Conclui-se que algumas das amostras estudadas apresentaram resistência relativa, a todos os antibióticos utilizados. Quando se compara as CIMs das amostras, com dados obtidos em outras partes do mundo, observa-se que o comportamento coincide com os já relatados em alguns aspectos mas, também apresentaram diferenças. Este comportamento pode estar refletindo, como já fora descrito para outros locais (1), uma situação particular própria das amostras isoladas na nossa região. Por esta razão é necessário realizar estudos similares, no futuro, a fim de se obter um quadro atualizado da evolução da resistência relativa e do comportamento in vitro de *N. gonorrhoeae*, frente aos antibióticos.

Referências Bibliográficas

1. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
2. Gordts, B.; Vanhoof, R.; Hubrechts, J.M.; Dierickx, R.; Coignau, H. & Butzler, J.P. - In vitro activity of 21 antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae* in Brussels. Brit. J. Vener. Dis., 58:23-28, 1982.
3. Jaffe, H.W.; Biddle, J.M.; Thornsberry, C.; Johnson, R.E.; Kaufman, R.E.; Reynolds, G.H. & Wiesner, P.J. - National gonorrhea therapy monitoring study: in vitro antibiotic susceptibility and its correlation with treatment results. N. Engl. J. Med., 294:5-9, 1976.
4. Meheus, A.; Piot, S.; Pattyn, E.; Vandyck, E. & Berghe, D.V. - Activity in vitro of ten antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae*: a study of the correlation between the sensitivities. Brit. J. Vener. Dis., 52:339-331, 1975.
5. Organizacion Mundial de La Salud - *Neisseria gonorrhoeae* e infecciones gonocócicas: informe de un grupo científico de la OMS. Serie de Informes Técnicos, nº 616, 1978.
6. Phillips, I.; Rimmer, D.; Ridey, M.; Lynn, R. & Warren, C. - In vitro activity of twelve antibiotic agents against *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet, 1:253-265, 1970.
7. Robson, H.G. & Salit, I.E. - Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to seven antibiotics in vitro. Can. Med. Assoc. J., 107:959-962, 1972.
8. Shahidullah, M. & Greavez, P.W. - Minimum inhibitory concentrations of penicillin and minocycline for 300 isolates of *Neisseria gonorrhoeae*. Brit. J. Vener. Dis., 51:265-266, 1975.
9. Sparling, P.F. - Antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Med. Clin. N.A., 56:1133-1144, 1972.
10. Stolz, E.; Swart, H.G.F. & Michel, M.F. - Activity of eight antimicrobial agents in vitro against *Neisseria gonorrhoeae*. Brit. J. Vener. Dis., 51:257-264, 1975.

ISOLATION OF ENTEROTOXIGENIC *ESCHERICHIA COLI* IN WATER AND SEWAGE IN SÃO PAULO, BRAZIL

Maria Inês Sato
Petra S. Sanchez
Maria Therezinha Martins

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

Maria Henriqueta L. dos Reis

Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
Deptº de Microbiologia e Imunologia
Campus de Araraquara
14800 Araraquara SP, Brasil

& Luiz Rachid Trabulsi

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

Summary

A search for enterotoxigenic *Escherichia coli* in sewage, polluted natural water, and contaminated drinking water revealed the presence of this bacterial pathogen in seven (1.9%) of 365 sewage samples and 12 (2.4%) of 494 polluted water samples examined. All but one strain isolated produced only heat labile enterotoxin and none had colonization factor CFA/I and CFA/II. The majority of strains were sensitive to the antibiotics tested. A diversity of serotypes was found, some of those already associated with human diarrhea.

Resumo

Isolamento de Escherichia coli enterotoxigênica em água e esgoto de São Paulo, Brasil

A pesquisa de *Escherichia coli* enterotoxigênica em esgoto, águas superficiais e água potável contaminada revelou a presença dessa bactéria em sete (1,9%) das 365 amostras de esgoto e em 12 (2,4%) das 495 amostras de água examinadas. Todas as cepas, com exceção de uma, produziram somente enterotoxina termolábil e nenhuma delas apresentou os fatores de colonização CFA/I e CFA/II. A maioria das cepas foi sensível aos antibióticos testados. Grande diversidade de sorotipos foi encontrada, alguns dos quais associados com diarréia em humanos.

Introduction

Enterotoxigenic *Escherichia coli* have been identified as a cause of diarrhea in humans and animals from several parts of the world (15, 20, 23, 25, 27), especially in developing countries, and has been the most common cause of acute diarrhea in travelers (11, 21). The disease caused by these organisms varies considerably in severity, ranging from a severe cholera-like syndrome with copious rice water diarrhea (24) to a mild illness of short duration with loss of small amounts of fluid (9, 25). These *E. coli* induce diarrheal disease by the production of either or both of two toxins: a heat-stable enterotoxin nonantigenic and a heat-labile enterotoxin antigenic and cholera-like (10, 28).

Although enterotoxigenic *E. coli* has been frequently isolated from feces, there is little epidemiological information on the environmental sources of these organisms. These pathogens were isolated from river water in Whiteriver, Arizona (25), from a tank water in Bangladesh (20) and were responsible for an outbreak of diarrheal disease which caused illness in more than 2000 persons who drank contaminated water at Crater Lake National Park in Oregon (19). Enterotoxigenic *E. coli* have been also detected in a large variety of foods, associated or not with diarrheal disease (11, 18, 26).

This study reports an investigation of the frequency of enterotoxigenic *E. coli* occurrence in sewage, polluted natural water and contaminated drinking water samples taken from the metropolitan area of São Paulo, Brazil.

Material and Methods

Samples - In an effort to obtain representative sampling of the travelling public and those people in the resident population that might have this infection, sewage collection points were selected and 365 samples taken from sites that included airports, harbors, railroad and bus stations and city hospitals. Polluted natural waters, reservoirs and fountains represented another group of 330 samples. A total of 164 treated water samples from the distribution system of the public supply were also examined.

Collection samples - Sewage samples were collected using the Moore swab technique (3) and transported to the laboratory in Cary and Blair transport medium. Water samples were collected according to Standard Methods (1) and sterile bottles included sodium thiosulfate to neutralize chlorine in the water samples taken from the water supply distribution system.

Bacteriological analysis of sewage - Sewage samples were enriched in lactose broth (double strength) and transferred to EC medium. After incubation at $44.5 \pm 0.2^\circ\text{C}$, the broth culture was streaked on Mac Conkey agar plates. Twelve lactose-positive colonies, with typical appearance of *E. coli*, were selected from each plate of Mac Conkey's agar, and transferred to Rugai and lysine-motility medium (14) and citrate Simmon's agar. The strains that presented characteristics of *E. coli* in these media were tested for production of heat-labile enterotoxin.

Bacteriological analysis of water - Water samples were analysed by membrane filter technique according to Standard Methods 15th edition (1). The lactose-positive colonies, which grew in M-Endo Agar Les, were enriched in lactose broth and transferred to brilliant green lactose bile broth and E.C. medium. After incubation, the broths were streaked on plates of eosin methylene blue agar (Levine's modification), and the typical colonies of *E. coli* were inoculated in Rugai and lysine-motility medium (14) and citrate Simmon's agar. The oxidase negative strains that presented characteristics of *E. coli* tested for production of heat-labile enterotoxin.

Testing for production of heat-labile enterotoxin - All strains of *E. coli* isolated from sewage and water were assayed for heat-labile production in the adrenal cells

tissue culture miniplate system, according to the method of Sack & Sack (22).

Characterization of enterotoxigenic E. coli - All toxigenic strains were biochemically confirmed as *E. coli*, according to Edwards & Ewing (7); and studied with regard to O and H antigens (7), production of heat stable enterotoxin by suckling mouse methods (5), susceptibility to the antibiotics chloramphenicol, kanamycin, gentamicin, ampicillin, nalidixic acid, cephalotin, coly-mycin, tetracycline, streptomycin and amikacin (4). The colonization factors CFA/I and CFA/II were assayed by mannose-resistant hemagglutination of human and bovine erythrocytes (8).

Results

A total of 3,853 colonies of *E. coli* were isolated from the 365 sewage samples. Seven out of these samples (1.9%) proceeding from seven different sewage collection sites presented toxigenicity (Table 1).

Related to polluted water, a total of 1982 strains of *E. coli* were analysed for production of heat labile toxin, enterotoxigenic *E. coli* was isolated from 9 (2.7%) of 330 polluted natural water samples and from 3 (1.8%) of 164 contaminated drinking water samples examined (Table 1).

All 21 enterotoxigenic strains isolated either from sewage or water produced only the heat-labile toxin, with a single exception of a strain that produced a heat-stable toxin too (Table 2). Colonization factors CFA/I and CFA/II were not detected in any of the 21 strains. Only three strains presented resistance to the antibiotics tested: one to streptomycin, one to tetracycline and another to ampicillin.

The serotypes of enterotoxigenic strains are shown in Table 2. Out of the 21 strains isolated, seven had the O serogroup not typable, and 14 belonged to several O serogroups, some of them already associated with human diarrhea. The invasive serogroup 0136 was isolated from one sample of filtered water, but the invasive ability of these LT strains were negative in the guinea pig eye (Serény test) and they have different biochemical characteristics from the typical entero-invasive *E. coli*.

Almost all enterotoxigenic *E. coli* were isolated in the first half of the year, i.e., in summer and autumn, which coincides with the higher incidence of human diarrhea which occurs in the summer.

Discussion

Enterotoxigenic *E. coli* has been isolated from cases of human diarrhea in different frequencies depending on geographical locality (9, 15, 20, 25). Investigations about the etiology of endemic infantile diarrhea in São Paulo (16) demonstrated the presence of enterotoxigenic *E. coli* (LT and LT/ST strains) in 8.2% of children with diarrhea and in 11.4% of controls without diarrhea (only LT strains).

The results detected in sewage are not in accord to the clinical findings, since enterotoxigenic *E. coli* was isolated only in 1.9% of sewage samples. These results could be influenced by toxic material presented in the sewage which may affect the survival of these bacteria. The use of 44.5°C for isolation of fecal coliforms might also have resulted in some loss in detection of enterotoxigenic *E. coli* as a stress factor, however this was not believed to be serious problem since *E. coli*

Table 1 - Frequency of enterotoxigenic *E. coli* isolated from sewage, polluted natural water and contaminated drinking water.

Symbols: a = out of 99,412 total routine samples; b = 0.003% positive for enterotoxigenic *E. coli* considering total routine samples

	Nº samples analysed	Nº samples with tox ^a <i>E. coli</i>	%
Sewage	365	7	1.9
Polluted natural water	330	9	2.7
Contaminated drinking water	164 ^a	3	1.8 ^b

isolated from human feces at 35°C were assayed at 44.5°C and thus demonstrated that growth were not affected by the elevated temperature.

The water may be an important vehicle in the transmission of enterotoxigenic *E. coli*, as documented in 1975 in a large waterborne outbreak at Crater Lake, Oregon (19). In our study the presence of these microorganisms was demonstrated in 0.003% of 99,412 samples of drinking water, of which 164 presented positive results for *E. coli*, and in 2.7% of raw water. Although enterotoxigenic *E. coli* were isolated in treated water, it was not possible to prove that these strains were associated with some cases of diarrhea.

In the present search, it was verified that the 14 heat-labile strains with identified O antigens belonged to 13 different O serogroups. Our results have parallel in the literature, where a great diversity of O groups has been detected among the heat labile *E. coli* (12, 16, 17, 21). The serogroups 025 and 088 detected in sewage and the serogroups 020, 0X3 and 0114 detected in water have been reported in intestinal infections in children and adults (2, 6, 11, 12, 13, 17, 21, 25). Only one heat labile strain (025) was among the seven more frequent O groups relationed with toxin production, originally cited by Ørskov & col. (13). The serogroup 0136 isolated from water sample, were not associated until now with enterotoxin production, however, these strains did not present invasive ability and had different biochemical characteristics from those of typical enteroinvasive *E. coli*.

The absence of colonization factor CFA/I and CFA/II confirms previous findings reported by Reis & col. (16, 17). Antibiotic sensitivity tests demonstrated that 86% of enterotoxigenic strains were multiply sensitive. Similar findings have been reported (11, 13, 19, 21, 25). However, Scaletsky & col. (unpublished data) in a study of antibiotic sensitivity of enterotoxigenic *E. coli* (heat-labile or heat-labile/heat-stable) isolated from food and feces of normal and diarrheal children in São Paulo, demonstrated that 50% of these strains presented resistance from one up to seven drugs.

In conclusion, enterotoxigenic *E. coli* were identified in sewage in water in São Paulo, Brazil. Since these organisms when presented in water may be involved with diarrheal disease of humans, either sporadically or in outbreaks, our findings are epidemiologically important and emphasize the necessity for drinking water quality to be free from fecal coliforms.

Acknowledgments

We thank Mr. Edwin E. Geldreich from EPA for his advice in preparation of this manuscript and Dr. Betty R. Davis from CDC for the serological identification of the strains not typable by us.

Table 2 - Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from sewage and water samples.

Symbols: a - LT⁺ = *Escherichia coli* that produced heat-labile toxin; ST⁺ = *Escherichia coli* that produced heat-stable toxin; b - n.t. = not typable, 0J16R = Ø related to *Shigella sonnei*

Sample	Origin	Date of collection	No strain	Toxin ^a	Serotype ^b
Sewage	affluents of treatment plants	January/79	1	LT ⁺ /ST ⁺	n.t:H ₁₀
		May/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	017:077:H ₁₈
		February/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	025:H ₇
		August/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	082:H ₈
		March/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	n.t:H ₂₅
	hospital	March/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	088:H ₂₅
		March/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	093:H ₈
		March/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	n.t:H ₄
		January/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	037:H ₄₀
		May/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	020:H ₇
Water	harbor	October/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	0J16R:H ₄₀
		February/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	n.t:H ₄₀
		May/79	1	LT ⁺ /ST ⁻	0X ₃ :H ₁₉
		March/80	1	LT ⁺ /ST ⁻	0J16R:H ₂₁
		May/80	1	LT ⁺ /ST ⁻	n.t:H ₄
	channel	November/80	2	LT ⁺ /ST ⁻	n.t:H ₄
		April/80	2	LT ⁺ /ST ⁻	0136:H ₄₀
		June/80	1	LT ⁺ /ST ⁻	0110:H ₇
		April/81	1	LT ⁺ /ST ⁻	0114:H ₂₁

References

1. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 15.ed. New York, APWA/AWWA/WPC, 1980.
2. Bäck, E.; Möllby, R.; Kaijser, B.; Stintzing, G.; Wadström, T. & Habte, D. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* and other gram-negative bacteria of infantile diarrhea: surface antigens, hemagglutinins, colonization factor antigen, and loss of enterotoxigenicity. *J. Infect. Dis.*, 142:318-327, 1980.
3. Barrett, T.J.; Blake, P.A.; Morris, G.K.; Puhr, N.D.; Bradford, H.B. & Wells, J.G. - Use of Moore swabs for isolating *Vibrio cholerae* from sewage. *J. Clin. Microbiol.*, 11:385-388, 1980.
4. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
5. Dean, A.G.; Ching, Y-C; 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.
6. DeBoy II, J.M.; Wachsmuth, I.K. & Davis, B.R. - Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. *Infect. Immun.*, 29:361-368, 1980.
7. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - The genus *Escherichia*. In: - Identification of *Enterobacteriaceae* (revised). Minneapolis, Burgess Publishing, p.67-107, 1972.
8. Evans, D.G. & Evans Jr., D.J. - New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.*, 21:638-647, 1978.
9. 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.
10. Levine, M.M.; Caplan, E.S.; Waterman, D.; Cash, R.A.; Hornick, R.B. & Snyder, M.J. - Diarrhea caused by *Escherichia coli* that produce only heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.*, 17:78-82, 1977.
11. Merson, M.H.; Morris, G.K.; Sack, D.A.; Wells, J.G.; Feeley, J.C.; Sack, R.B.; Creech, W.B.; Kapikian, A.Z. & Gangarosa, E.J. - Travelers' diarrhea in Mexico: a prospective study of physicians and family members attending a congress. *N. Engl. J. Med.*, 294:1299-1305, 1976.
12. Merson, M.H.; Ørskov, F.; Ørskov, I.; Sack, R.B.; Hug, I. & Koster, F.T. - Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 23:325-329, 1979.
13. Ørskov, F.; Ørskov, I.; Evans Jr., D.J.; Sack, R.B.; Sack, D.A. & Wadström, T. - Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhoea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.*, 162:73-80, 1976.
14. Pessoa, G.V.A. & Silva, E.A.M. - Milieu pour l'identification présumptive rapide des enterobactéries, des *Aeromonas* et des vibrions. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 125(A):341-347, 1974.
15. Pickering, L.K.; Evans Jr., D.J.; Muñoz, O.; DuPont, H.L.; Coelho-Ramirez, P.; Vollet, J.J.; Conklin, R.H.; Olarte, J. & Kohl, S. - Prospective study of enteropathogens in children with diarrhea in Houston and Mexico. *J. Pediatr.*, 93:383-388, 1978.
16. Reis, M.H.L.; Guth, B.E.C.; Gomes, T.A.T.; Murahowschi, J. & Trabulsi, L.R. - Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat-labile toxin or heat-stable toxin or both in children with and without diarrhea in São Paulo. *J. Clin. Microbiol.*, 15:1062-1064, 1982.
17. Reis, M.H.L.; Matos, D.P.; Castro, A.F.P.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes, and sources of strains in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 28:24-27, 1980.
18. Reis, M.H.L.; Vasconcelos, J.C. & Trabulsi, L.R. - Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:270-271, 1980.

19. Rosenberg, M.L.; Koplan, J.P.; Wachsmuth, I.K.; Wells, J.G.; Gangarosa, E.J.; Guerrant, R.L. & Sack, D.A. - Epidemic diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*: a large waterborne outbreak. Ann. Intern. Med., 86:714-718, 1977.
20. Ryder, R.W.; Sack, D.A.; Kapikian, A.Z.; McLaughlin, J.C.; Chakrabarty, J.; Rahman, A.S.M.M.; Merson, M.H. & Wells, J.G. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* and reovirus-like agent in rural Bangladesh. Lancet, 1:659-663, 1976.
21. Sack, D.A.; Kaminsky, D.C.; Sack, R.B.; Wamola, I.A.; Ørskov, F.; Ørskov, I.; Slack, R.C.B.; Arthur, R.R. & Kapikian, A.Z. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea of travelers: a prospective study of American Peace Corps Volunteers. Johns Hopkins Med. J., 141:63-70, 1977.
22. Sack, D.A. & Sack, R.B. - Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y-1 adrenal cells in miniculture. Infect. Immun., 11:334-336, 1975.
23. Sack, R.B. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol., 29:333-353, 1975.
24. Sack, R.B.; Gorbach, S.L.; Banwell, J.G.; Jacobs, B.; Chatterjee, B.D. & Mitra, R.C. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. J. Infect. Dis., 123:378-385, 1971.
25. Sack, R.B.; Hirschhorn, N.; Brownlee, I.; Cash, R.A.; Woodward, W.E. & Sack, D.A. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* associated diarrheal disease in Apache children. N. Engl. J. Med., 292:1041-1045, 1975.
26. Sack, R.B.; Sack, D.A.; Mehlman, I.J.; Ørskov, F. & Ørskov, I. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. J. Infect. Dis., 135:313-317, 1977.
27. Smith, H.W. & Hall, S. - Observations by the ligated intestinal segment and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Pathol. Bacteriol., 93:499-529, 1967.
28. Wachsmuth, K.; Wells, J.; Shipley, P. & Ryder, R. - Heat-labile enterotoxin production in isolates from a shipboard outbreak of human diarrhea illness. Infect. Immun., 24:793-797, 1979.

FLORA ANAERÓBIA VAGINAL DE MULHERES SEM INFECÇÃO GENITAL APARENTE

Marina Baquerizo Martinez
Roberto A. de Almeida Moura
Elsa Massae Mamizuka
Maria de Fátima Borges Pavan

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Deptº de Análises Clínicas e Toxicológicas
Caixa Postal 30786
01000 São Paulo SP, Brasil

& Laercio Ribeiro Porto Junior

Coordenadoria de Saúde e Assistência Social USP
Caixa Postal 11458
01000 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Da secreção vaginal de 94 mulheres sem infecção genital aparente, bactérias anaeróbias obrigatórias foram isoladas de 53 amostras (56%), com predominância dos gêneros *Bacteroides* (26,4%) e *Peptostreptococcus* (17%). Estes organismos estão frequentemente envolvidos em infecções, no trato genital feminino, sugerindo que a flora normal da vagina seja potencialmente patogênica.

Summary

Anaerobic bacteria from the vagina of women without apparent gynecological infection

From the vagina of 94 women without apparent gynecological infection, anaerobic bacteria were isolated from 53 samples (56%), with predominance of *Bacteroides* (26.4%) and *Peptostreptococcus* (17%). These microorganisms are frequently involved in genitourinary infections, suggesting that normal flora of the vagina is potentially pathogenic.

Introdução

O estudo da flora normal tem sido altamente valorizado no decorrer da última década. Wilson (14) considerou o estudo da flora normal bacteriana prioritário, para compreensão da etiologia das infecções humanas.

O organismo humano, de uma maneira ou de outra, tem sido vítima de infecções causadas pelo desenvolvimento anômalo da própria flora (14).

Dentre os estudos da flora normal, o estudo da flora autóctone da porção inferior do trato genital feminino, é dos mais oportunos. Ohm & Galask (9) definem este conhecimento como básico para o estudo de infecções em obstetrícia e ginecologia. Esses autores mencionaram que alterações da flora normal podem produzir vaginites e que estas podem evoluir para infecções do trato genital superior e mesmo infecções sistêmicas.

Estudos mais recentes demonstraram que bactérias anaeróbias são importantes constituintes da flora endógena vaginal (1, 4, 6).

Segundo Levison & col. (7), os resultados de vários estudos da flora bacteriana do trato genital feminino são conflitantes. Para eles, poucos são os autores que têm estudado a complexa flora vaginal de um modo satisfatório.

Em revisão da literatura especializada nacional, não encontramos nenhum estudo da flora anaeróbia vaginal em nosso meio.

Visando contribuir para um maior esclarecimento da incidência de bactérias anaeróbias no trato genital feminino, e tendo em conta a importância do conhecimento desta flora, no estudo de infecções, em obstetrícia e ginecologia, realizamos culturas para o isolamento destas bactérias de 94 amostras de conteúdo vaginal de mulheres que não apresentavam infecção genital aparente, usando diferentes meios de cultura.

Material e Métodos

Foi colhido material vaginal de 94 mulheres sem infecção genital aparente, sendo 76 universitárias, inscritas no Serviço Médico da Coordenadoria de Saúde e Assistência Social (COSFAS) da Universidade de São Paulo e 18 provenientes do Ambulatório da Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A idade das mulheres variou de 18 a 45 anos.

Nenhuma paciente havia sido medicada com antibióticos, pelo menos nas 24 horas que antecederam à colheita do material.

Após a introdução do espéculo, foram instilados 3ml de solução fisiológica estéril no fundo do saco de Douglas. O material foi colhido por aspiração, por meio de uma pipeta de vidro reforçado, estéril. A pipeta foi colocada em tubo estéril e o material foi semeado em seguida, evitando-se, assim, a utilização de um meio de transporte.

Foi utilizado o sistema "Gaspak" (BBL - Becton, Dickinson & Co.) para obtenção de anaerobiose.

Foram utilizados três meios de cultura para o isolamento de bactérias anaeróbias: dois métodos seletivos: Ágar-sangue-fenil-etil-álcool (Difco) e Ágar-Columbia (Difco) acrescido de sangue lisado de carneiro (5%), Vancomicina e Kanamicina (LKV) (15), e um meio não seletivo: Ágar-Columbia (Difco), acrescido de sangue de carneiro (5%). Os meios utilizados foram suplementados com solução de hemina e vitamina K (1%).

As identificações destas bactérias foram feitas de acordo com o "Manual of Virginia Polytechnic Institute (VPI)" (5).

De todas as amostras coletadas foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram modificado por Hüber.

Resultados

Das 94 amostras estudadas, 53 (56,4%) tinham bactérias anaeróbias, num total de 73 cepas.

Na Tabela 1 estão relacionadas as espécies bacterianas anaeróbias isoladas no conteúdo vaginal de 94 mulheres. Como podemos observar, os bacilos Gram-negativos foram as bactérias mais isoladas (26,6%).

Tabela 1 - Bactérias anaeróbias isoladas do conteúdo vaginal de 94 mulheres

Bactérias	Amostras	
	+	%
Cocos Gram-positivos	17	18,1
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	9	9,6
<i>Peptococcus</i> sp.	3	3,2
não identificados	5	5,3
Cocos Gram-negativos	3	3,2
<i>Veillonella</i> sp.	3	3,2
Bacilos Gram-positivos	12	12,8
<i>Lactobacillus</i> sp.	5	5,3
<i>Streptococcus</i> sp.	1	1,1
<i>Clostridium</i> sp.	2	2,1
não identificados	4	4,3
Bacilos Gram-negativos	25	26,6
<i>Bacteroides</i> sp.	14	14,9
<i>B. melaninogenicus</i>	4	4,3
<i>B. capillosus</i>	3	3,2
<i>B. vulgaris</i>	1	1,1
<i>B. fragilis</i>	1	1,1
<i>Bacteroides</i> sp.	5	5,3
<i>Fusobacterium</i>	5	5,3
não identificados	6	6,4
Coccobacilos não identificados	16	17,0

Discussão e Conclusão

Podemos observar em vários trabalhos, diferenças marcantes na frequência de isolamentos de bactérias anaeróbias do trato genital inferior feminino (1, 4, 7, 8, 9,

9, 12). A incidência de bactérias anaeróbias varia de 8% (8) a 86% (9). As diferenças observadas estão relacionadas a fatores ligados à própria população estudada e às técnicas empregadas na coleta, isolamento e identificação das bactérias anaeróbias (7).

O presente trabalho mostra que as bactérias anaeróbias constituem um componente significante da flora normal da vagina (56%). Esta flora, normalmente, é complexa, contendo muitas espécies de microrganismos com graus variáveis de aerotolerância.

Os resultados obtidos, de um modo geral, são similares a outros estudos (2, 3, 4, 7, 12, 14). Contudo, a taxa de isolamento de cocos Gram-positivos foi menor que a encontrada em vários trabalhos (2, 3, 4, 7, 12). Vários fatores podem ter contribuído: metodologia utilizada, tanto na coleta das amostras como na cultura para anaeróbios, ou mesmo diferenças na população estudada.

Observa-se nos trabalhos citados, que não existe uma padronização na metodologia usada no estudo das bactérias anaeróbias da flora vaginal, principalmente quanto aos meios de cultura empregados.

As bactérias anaeróbias isoladas do conteúdo vaginal, frequentemente estão envolvidos em infecções pélvicas (10, 11, 13), sugerindo que a flora normal da vagina seja potencialmente patogênica. Assim, são indispensáveis maiores estudos sobre ela, com metodologia padronizada, para que tenhamos mais dados sobre a flora de nossa população.

Referências Bibliográficas

1. Bartlett, J.G.; Moon, N.E.; Goldstein, P.R.; Goren, B.; Anderdonk, A.B. & Polks, B.F. - Cervical and vaginal bacterial flora: ecologic niches in the female lower genital tract. Amer. J. Obstet. Gynecol., 130:658-661, 1978.
2. Bartlett, J.G.; Onderdonk, A.B.; Drude, E.; Goldstein, F.; Anderka, M.; Alpert, S. & McCormack, W.M. - Quantitative bacteriology of the vaginal flora. J. Infect. Dis., 136:271-277, 1977.
3. Corbishley, C.M. - Microbial flora of the vagina and cervix. J. Clin. Path., 30:745-748, 1977.
4. Gorbach, S.L.; Menda, K.B.; Thadepalli, H. & Keith, L. - Anaerobic microflora of the cervix in healthy women. Amer. J. Obstet. Gynecol., 1977:1053-1055, 1973.
5. Holdeman, L.V.; Cato, E.P. & Moore, W.E.C. - Anaerobic laboratory manual. 3.ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, 132p., 1975.
6. Larsen, B. & Galask, R. - Vaginal microbial flora: practical and theoretic relevance. Obstet. and Gynecol., 55:100s-113s, 1980.
7. Levison, M.E.; Corman, L.C.; Carrington, E.R. & Kaye, D. - Quantitative microflora of the vagina. Amer. J. Obstet. Gynecol., 127:80-85, 1977.
8. Neary, M.P.; Allen, J.; Okubadejo, O.A. & Payne, D.J.H. - Preoperative vaginal bacteria and postoperative infections in gynaecological patients. Lancet, 2:1291-1294, 1973.
9. Ohm, M.J. & Galask, R.P. - Bacterial flora of the cervix from 100 prehysterectomy patients. Amer. J. Obstet. Gynecol., 122:283-287, 1975.
10. Sweet, R.L. - Anaerobic infections of the female genital tract. Am. J. Obstet. Gynecol., 122:891-901, 1975.
11. Swerson, R.M.; Michaelson, T.C.; Daly, M.J.; Facog & Spaulding, E.H. - Anaerobic bacterial infections of the female genital tract. Obstet. Gynecol., 42:538-541, 1973.
12. Tashjian, J.H.; Coulam, C.B. & Washington II, J.A. - Vaginal flora in asymptomatic women. Mayo Clin. Proc., 51:557-561, 1976.
13. Ulson, C.M.; Hutzler, R.V.; Sinto, S.I.; Kirchner, E.E.; Rodrigues, E.; Peixoto, S. & Salvatore, C.A. - Aspectos microbiológicos de alguns quadros clínicos de infecções puererais e pós-abortamento séptico visando em especial aos anaeróbios. Rev. Inst. Med. Trop., 21:24-66, 1979.
14. Wilson, G. - The normal flora of man: introduction, general considerations and importance. In: - Skinner, F.A. & Carr, J.G. - The normal flora of man. 2.ed. New York, Academic Press, p.1, 1975.

LICOR SULFÍTICO (LICOR NEGRO) COMO SUBSTRATO PARA O CRESCIMENTO DE CANDIDA UTILIS: ESTUDO EXPERIMENTAL

Ernani Sebastião Sant'Anna

Deptº de Ciéncia e Tecnologia de Alimentos
Centro de Ciéncias Agrárias UFSC
Caixa Postal 476
88000 Florianópolis SC, Brasil

& Eugênio Aquarone

Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacéutica
Faculdade de Ciéncias Farmacéuticas USP
Caixa Postal 30786
01000 São Paulo SP, Brasil

Resumo

O presente trabalho verifica as características do licor sulfítico (licor negro, lixívia sulfítica) de uma fábrica de papel do Sul do país. Estudou-se a retirada do SO₂ por aquecimento e verificou-se que um tempo de aquecimento de 15 minutos deixa o licor em níveis aceitáveis. Desde que suplementado com nitrogênio, fósforo e potássio, o licor sulfítico permite o crescimento de *Candida utilis*, e a concentração ideal de ART fica em torno de 1,0%.

Summary

Sulphite liquor as a medium for the growth of Candida utilis

The growth supporting value of sulphite liquor (black liquor, sulphite leach) for *Candida utilis* was studied. The toxic SO₂ concentration of the liquor could be reduced to acceptable levels by heating for 15 minutes. De-toxified sulphite liquor supplemented with nitrogen, phosphorus and potassium salts allowed good growth of *Candida utilis*. The optimum level of total reducing sugars (TRS) was found to be around 1%.

Introdução

Licor sulfítico, licor negro ou lixívia sulfítica é efluente residual aquoso, resultante da fabricação de papel e celulose, quando se utiliza o processo sulfito, ou seja, tratamento com solução aquosa de ácido sulfuroso, contendo um cátion, que pode ser cálcio, magnésio ou sódio (1). A composição do licor sulfítico é muito variável (10, 20), principalmente quanto ao teor de açúcares. Este grau de variação é resultante dos tipos de madeira utilizados e da temperatura do processo. O licor sulfítico, oriundo de madeiras duras, apresenta teor de açúcares redutores totais em torno de 3%, contendo xilose e arabinose e cerca de 20% da fração, hexoses, enquanto que no caso de madeiras moles a concentração de açúcares redutores totais não é maior que 2%, onde 75% da fração é representada por hexoses sendo o restante

pentoses (18, 22, 23, 24).

A utilização prática deste licor tem razões econômicas e ecológicas. Em 1980, a produção de celulose e papel pelo processo sulfito, foi de 57.176 toneladas (2). A quantidade de licor resultante foi em torno de 400.232.000 litros. Desta forma, é de suma importância que seja feito algum tipo de tratamento neste resíduo, procurando minimizar o seu alto grau de poluição (21, 22, 23).

Há informações sobre plantas industriais para obtenção de álcool (12), emprego do licor para produção de álcool e proteína (16, 26), para obtenção de biomassas, ricas em proteínas, a partir do crescimento de *Candida utilis* (5) e outros microrganismos (14, 27).

Material e Métodos

A levedura utilizada neste trabalho foi *Candida utilis*, cedida gentilmente pelo Instituto Zimotécnico da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queirós. O microrganismo foi adaptado ao licor sulfítico, utilizando-se Agar Sabouraud onde a água de diluição foi substituída, paulatinamente, por concentrações crescentes de licor sulfítico, obtido de indústria de papel e celulose do Estado do Rio Grande do Sul. O SO₂ presente no substrato foi eliminado por aquecimento, verificando-se quais as melhores condições para a eliminação. Foi feita a determinação dos seguintes componentes: carbono orgânico total (13), sólidos totais (11), enxofre (19), nitrogênio, pentoses e hexoses (3), fósforo (7), cálcio (6), potássio e sódio (17) e açúcares redutores totais (25).

O experimento fermentativo foi desenvolvido em frascos Erlenmeyers de 500ml, com algumas modificações de tal forma a terem três aletas internas que permitissem uma maior turbulência e consequente aeração. O agitador utilizado foi de rotação fixa em 180rpm com passo de 3cm e a temperatura de propagação dos microrganismos foi regulada em sala termostatizada, a 30°C.

Candida utilis, previamente aclimatada, foi mantida em Agar Sabouraud inclinado, contendo licor sulfítico. Uma alçada do microrganismo foi transferida para um tubo de ensaio, o qual continha 20ml de meio com 5% de glicose, 0,1% de uréia, 0,05% de fosfato dibásico de potássio e 1,0% de extrato de malte em licor sulfítico. O pH do meio foi ajustado em 4,5. A levedura desenvolvida neste meio foi utilizada para inocular 100ml do mesmo meio em um dos frascos de 500ml. O frasco foi agitado durante 24 horas a 180rpm e, após este período, 50ml do meio foi centrifugado a 2000rpm durante 5 minutos; as células centrifugadas foram lavadas com água destilada esterilizada e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi então desprezado e as células foram resuspensas no volume original e usadas para inocular 1 litro do meio a ser estudado. O meio foi então distribuído nos frascos Erlenmeyer de 500ml com volume útil de 100ml.

Resultados e Discussão

Eliminação do SO₂ - A variação do SO₂ residual, em função do tempo de aquecimento a 100°C revela que o tratamento não consegue eliminar totalmente o SO₂; aproximadamente 0,3 gramas por litro ficam retidos no licor sulfítico, provavelmente devido à forma com que o sulfito se apresenta no licor (Fig.1). Geralmente apresenta-se nas formas livres e combinada. O tratamento aplicado retira somente o sulfito na sua forma livre, ou naqueles casos em que está fracamente ligado a outros compostos. Entretanto, quando o radical interage de maneira mais forte com outros compostos, sua extração, pela aplicação do calor, torna-se mais difícil, explicando-se, desta forma, a permanência de quantidade de SO₂, independentemente do tempo de aquecimento.

Um tempo de tratamento de 15 minutos foi suficiente para deixar o licor sulfítico com níveis aceitáveis de SO₂, pois, na concentração indicada, *C. utilis* consegue desenvolver-se bem.

Composição do licor sulfítico - O teor de enxofre do licor sulfítico utilizado está em torno de 2,65 gramas por litro o que contrasta um pouco com os resultados encontrados na literatura (Tabela 1). Inskeep & col. (10) encontraram entre 8,0 e 10,0 gramas por litro de sulfito, em licor sulfítico, obtido a partir de abeto. Esta diferença pode ser justificada pelo fato da análise, no nosso licor sulfítico, não ter sido efetuada no próprio local da coleta. O licor sulfítico, ao sair dos digestores, está com temperatura superior a 100°C, o que provoca a volatilização do SO₂. O transporte deste material também colabora para a volatilização, acarretando diminuição do teor de enxofre.

A quantidade de açúcares redutores totais é muito variável, mas os resultados encontrados também estão citados na literatura (20). Entretanto, encontram-se maiores variações, no tocante à quantidade de hexoses e pentoses, pois, esta é uma característica estriada do tipo de madeira utilizada. Do total de 1,458g/100ml de açúcares redutores totais, 0,403g/100ml são pentoses, o que equivale a dizer que 27,6% dos açúcares são pentoses, e 72,4% são hexoses (Tabela 1). Tais concentrações são similares às encontradas na literatura (9, 10, 14, 15, 20).

Tabela 1 - Composição do liquor sulfítico

Análise	Concentração g
Carbono orgânico total	6,88
Sólidos totais	14,74
Cinzas	1,79
Enxofre (todas formas de SO ₂)	0,265
Nitrogênio total	0,017
ART	1,458
Pentoses	0,403
Hexoses	1,055
Fósforo	-
Potássio	-
Cálcio	0,618
Sódio	-
pH	3,1

Figura 1 - Eliminação do SO₂ por arraste de vapor

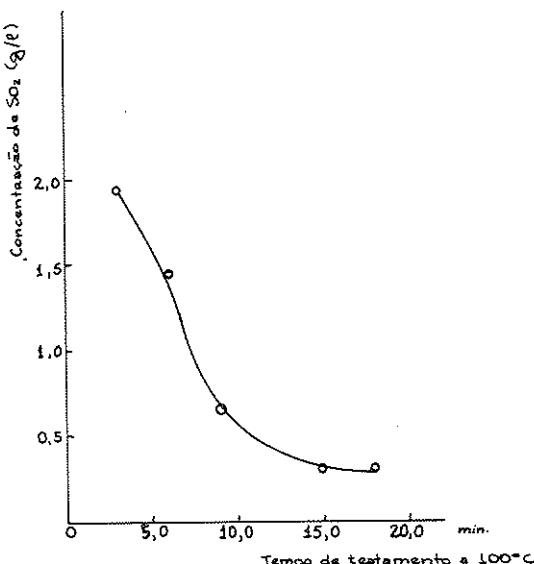
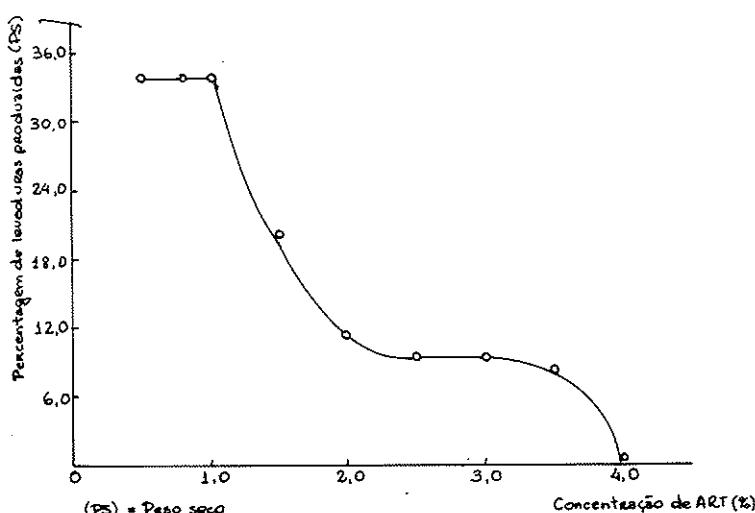


Figura 2 - Verificação de crescimento de *Candida utilis* em diversas concentrações de ART do licor sulfítico durante 15 horas de fermentação



O pH é uma função da quantidade de SO₂ existente no licor, já que no licor sem tratamento é de 3,1 e no licor tratado é de aproximadamente 4,2. Lefrançois & Revuz

(15) encontram um valor de pH, para licor sulfítico sem tratamento entre 2,5 e 3,0. As quantidades de fósforo, potássio e nitrogênio são insignificantes, daí a necessidade de suplementá-las, para que se possa obter crescimento satisfatório dos microrganismos (22).

Verificação do crescimento celular em diversas concentrações de açúcares no licor sulfítico, em frascos agitados - A concentração excessiva de açúcar, no meio de crescimento, em presença de oxigênio, leva à repressão do sistema respiratório, o que acarreta diminuição significativa na velocidade de multiplicação dos microrganismos, caracterizando o chamado efeito "Crabtree" (22). Concentrações de glicose, superiores a 5%, inibem a síntese de enzimas respiratórias dos microrganismos e a formação da mitocondria. A Figura 2 e a Tabela 2 mostram resultado do melhor crescimento celular; em função da concentração de açúcares redutores totais, durante o período de 15 horas de fermentação. A concentração ideal de açúcares redutores totais ficou em torno de 1%. Concentrações maiores acarretam diminuição do rendimento (leveduras produzidas/açúcar redutor total consumido), até o ponto em que com 4% de ART as células não conseguem multiplicar-se. Concentrações inferiores a 1% não prejudicam o rendimento, entretanto é interessante que se empregue a maior concentração útil possível de açúcares redutores totais, sem prejuízo do rendimento, para que o processo se torne mais econômico. Quando são utilizados outros substratos como o melâço, a concentração de 4% de açúcares redutores totais não chega a causar maiores problemas, a não ser pequena queda do rendimento. No caso do licor sulfítico, onde se observou um crescimento "zero", pode-se concluir que existem algumas substâncias inibidoras que, com o aumento da concentração dos sólidos totais (também aumenta a concentração de substâncias inibidoras), atingem níveis extremamente prejudiciais ao desenvolvimento dos microrganismos.

Tabela 2 - Verificação do crescimento de *Candida utilis* em diversas concentrações de ART do licor sulfítico durante 15 horas de fermentação.

Símbolos: * = Rendimento = $\frac{\text{Leveduras produzidas}}{\text{ART utilizado}} \times 100$

Concentrações de ART (g%) (p/v)	0,5	0,8	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Levedura total ao término de 15 horas (g%)	0,1771	0,2786	0,3458	0,2708	0,1399	0,0762	0,0521	0,0480	0,0000
Leveduras produzidas ao término de 15 horas (g%)	0,1391	0,2406	0,3078	0,2328	0,1019	0,0382	0,0141	0,0100	0,0000
ART utilizado (g%) (p/v)	0,411	0,711	0,91	1,158	0,862	0,404	0,148	0,120	0,0000
ART não utilizado (g%) (p/v)	0,089	0,090	0,090	0,342	1,138	2,096	2,852	3,38	4,0000
Percentagem de ART utilizado	82,2	88,7	91,0	77,2	43,1	16,16	4,93	3,42	0,00
Rendimento* (%)	33,85	33,90	33,83	20,10	11,82	9,45	9,52	8,33	0,00

Os estudos preliminares indicam que o licor sulfítico (licor negro ou lixívia sulfítica), desde que detoxificado e devidamente suplementado com nitrogênio, fósforo e potássio possibilita o crescimento de *C. utilis*. O tratamento térmico, aplicado ao licor sulfítico, mostrou ser satisfatório e o SO₂ remanescente demonstrou não ter efeito inibitório sobre o microrganismo, já que o rendimento encontrado está de acordo com o citado pela literatura. A melhor concentração de açúcares redutores totais foi de 1,0%. Nesta concentração *C. utilis* utilizou 91,0% dos ART disponíveis, apresentando rendimento de 33,83%.

Referências Bibliográficas

1. Anderson, A. - Converts waste to 50% protein *Torula*. Food Process, 35:58-59, 1978.
2. Associação Técnica Brasileira de Celulose e Papel - ATBCP Informação pessoal, 1982.

3. Association of Official and Agricultural Chemistry - AOAC - Official methods of analysis. 13.ed. Washington, 1980.
4. Camhi, I.G. & Rogers, P.L. - Multistage continuous of *Candida utilis* on spent sulphite liquors. *J. Ferment. Technol.*, 54:437-449, 1976.
5. Casida Jr., L.E. - Industrial microbiology. New York, John Wiley & Sons, p.367-368, 1968.
6. Ferro, P.U.A.S. & Ham, A.M. - Colorimetric determination of calcium by chloranilic acid. II - A semi-micro method with reduced precipitation time. *Amer. J. Clin. Path.*, 28:689-692, 1975.
7. Fiske, C.H. & Sabarow, V. - The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375-400, 1925.
8. Harris, E.E.; Saeman, J.F.; Marquardt, R.R.; Hannan, M.L. & Rogers, S.C. - Fooder yeast from wood hydrolyzates and still residues. *Ind. Engin. Chem.*, 40:1220-1223, 1948.
9. Holderby, J.M. & Moggio, W.A. - Utilization of spent sulphite liquors. *J. WPCF*, 32:171-181, 1960.
10. Inskeep, G.C.; Wiley, A.J.; Holderby, J.M. & Hughes, L.P. - Food yeast from sulphite liquor. *Ind. Engin. Chem.*, 43:1702-1711, 1951.
11. Instituto Adolfo Lutz - Normas analíticas. 2.ed. São Paulo, 1976.
12. Irving, R. - Commercial yeast manufacture. In: - Underkofer, L.A. & Hickey, R.J., eds. - Industrial fermentations. New York, Chem. Pub., p.273-306, 1954.
13. Kalembasa, S.J. & Jenkinson, D.S. - A comparative study of titrimetric and gravimetric methods for the determination of organic carbon in soil. *J. Sci. Food Agric.*, 24:1085-1090, 1973.
14. Leduy, A.; Kosaric, N. & Zajic, J.E. - Transfer function matrix of the continuous cultivation system of *Morchella crassipes* in ammonia base waste sulphite liquor. *Biotechnol. and Bioengin.*, 19:1653-1666, 1977.
15. Lefrançois, L. & Revuz, B. - Levures de lessives sulfítiques. *Ind. Alim. Agri.*, 81:1175-1181, 1964.
16. Lima, O.G. de - Os resíduos da indústria do álcool de melão de cana como matéria prima na produção microbiológica de proteínas. Recife, Escola Superior de Química da Universidade do Recife. Publicação nº 8 da Cátedra de Microbiologia Industrial.
17. Masson, W.D. - Fotometria de lhama. In: - Henry, J. & Cannon, D.C., eds. - Química clínica. Barcelona, p.49-64, vol.1, 1980.
18. Mulvany, P.K.; Agar, H.D.; Peniston, Q.P. & McCarthy, J.L. - A chromatographic study of sulphite waste liquor sugar. *J. Am. Chem. Soc.*, 73:1255-1257, 1951.
19. Palacio, H. - Fabricacion de alcohol. Barcelona, Salvat, 1956.
20. Peniston, Q.P. & McCarthy, J.L. - Lignin. I - Purification of lignin sulfonic acids by continuous dialysis. *J. Am. Chem. Soc.*, 70:1324, 1948.
21. Prescott, S.C. & Dunn, C.G. - Industrial microbiology. 3.ed. Tokyo, Kogakusha, 945p., 1959.
22. Reed, G. & Peppler, H.J. - Yeast technology. Westport, Connecticut, Avi., 371p., 1973.
23. Romantschuk, H. - The Pekilo process: protein from spent sulphite liquors. In: - Tannenbaum, S.R. & Wang, D.I.C., eds. - Cambridge, Mass., MIT Press, 1978.
24. Roschier, H. & Aaltio, E. - Alcoholic fermentation of sulphite waste liquor. In: - Underkofer, L.A. & Hickey, R.J., eds. - Industrial fermentations. New York, Chem. Pub., vol.1, 105p., 1954.
25. Somogy, M. - A new reagent for the determination of sugar. *J. of Biological Chemistry*, 160:61-69, 1945.
26. Stupiello, J.P. - Matérias primas para obtenção de álcool. In: - Informações técnico-científicas; fermentações industriais, biodegradação e transformações microbianas do solo. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1978.
27. Toyama, N. & Ogawa, K. - Utilization of cellulosic wastes by *Trichoderma viride*. *Ferment. Technol. Today*, 2:743-757, 1972.

ISOLAMENTO DE LISTERIA MONOCYTOGENES DE LÍQUIDO CEFALORRA-
QUIDIANO, EM RECIFE, PERNAMBUCO

Nilma Cintra Leal

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
Fiocruz
Rua de Espinheiro, 106
Espinheiro
50000 Recife PE, Brasil

Ernesto Hofer

Deptº de Bacteriologia
Instituto Oswaldo Cruz
Caixa Postal 926
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Marinalva Ferreira da Costa
& Agenor Tavares de Sá

Laboratório Central da FUSAM
Rua Fernandes Vieira, s/n
Boa Vista
50000 Recife PE, Brasil

Resumo

Isolamento e caracterização de uma amostra de *Listeria monocytogenes* sorotipo L 4 ab, oriunda de líquido cefalorraquidiano de criança com 12 dias de idade, com sintomas de meningite. Esta é provavelmente, a primeira descrição deste microrganismo em LCR, na região nordeste do Brasil.

Summary

Isolation of Listeria monocytogenes from cerebrospinal fluid, in Recife city, Brazil

Isolation and characterization of a strain of *Listeria monocytogenes* serotype L 4 ab, from cerebrospinal fluid from a 12 days old child with meningitis symptoms. This is probably the first report of this organism from cerebrospinal fluid in Northeast of Brazil.

São raras as referências específicas, sobre o isolamento e identificação de *Listeria monocytogenes*, de casos humanos de meningite ou meningo-encefalite, no Brasil (Suassuna, I. & col., Anais de Microbiol., 16:161, 1969; Takeuchi, C. & col., Rev. Inst. Adolfo Lutz, 34:101, 1974; e Esper, M.R.N.R. & col., Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:37, 1978). Na região nordeste do país, possivelmente a primeira referência ao germe.

O material clínico era de paciente internado no Hospital da Restauração, Recife PE, com 12 dias de idade, sexo masculino e apresentando como sinais mais proeminentes, febre, fontanela anterior tensa e abaulada. O estado geral foi dado como gra-

ve. Apesar da terapêutica, à base de cloranfenicol e ampicilina, o óbito ocorreu em quatro dias de tratamento.

O líquor, de aspecto turvo, foi semeado em agar Mueller Hinton, com 1% de soro de coelho, agar Mueller Hinton chocolate e mesma base com 5% de sangue de carneiro. Após a incubação a 37°C por 24 horas, observou-se a presença de pequenas colônias que, no agar sangue, evidenciaram discreto halo de hemólise total. As características morfo-tintoriais, revelaram pequenos bacilos Gram positivos, destituídos de granulações citoplasmáticas.

Em decorrência dos achados bacterioscópicos, a suspeição concentrou-se na possibilidade de tratar-se de *Listeria*, fato este, corroborado quando se observou o comportamento da amostra em agar semi-sólido, incubado nas temperaturas de 30 e 37°C. A mobilidade típica e compatível para *Listeria* só ocorreu na temperatura abaixo de 37°C.

A identificação sorológico foi efetuada pelo processo de aglutinação rápida (em lâminas) e confirmado pela aglutinação lenta, seguindo as recomendações do Donker-Voet (Amer. J. Vet. Res., 20:176, 1959), caracterizando-se o sorotipo L 4 de *Listeria monocytogenes*.

No antibiograma, realizado pela técnica descrita por Bauer, A.W. & col. (Am. J. Clin. Path., 45:493, 1966), a amostra foi sensível à kanamicina, tetraciclina, gentamicina, sisomicina, cefalotina, eritromicina, cloranfenicol e lincomicina.

Do ponto de vista epidemiológico, não foi possível obter qualquer dado como elemento auxiliar para o estudo geral deste acontecimento. Entretanto, considerando a faixa etária do portador, admite-se a contaminação materna, como causa primordial do comprometimento do recém-nascido.

Tabela 1 - Características bioquímicas e de patogenicidade da amostra isolada.

Símbolos: (*) = 48 horas (2d); (***) = 96 horas (4d); (****) = Cerratoconjuntivite em cobaia após 48 horas

Provas	Resultados
Catalase	+
Oxidase	-
Indol (sim)	-
H ₂ S (sim)	-
Urease	-
VA	+
VP (Barritt)	+
Adonitol	-
Arabinose	-
Dulcitol	-
Galactose	-
Glicose	+ (s/gás)
Lactose	+ (*)
Sacarose	+ (**) -
Manitol	-
Rhamnose	+
Salicina	+
Xilose	-
Treloose	+
Inositol	-
Celobiose	+
Prova de Anton	+ (***)

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Alcoolquímica Informativo, 1(1):1-6, Jan. 1983. Brasília, Núcleo de Comunicação Social STI/MIC, 1983.

A Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério de Indústria e Comércio, em convênio com o Centro de Pesquisas e Desenvolvimento - CEPED do Estado da Bahia, iniciou a edição, em janeiro de 1983, de "Alcoolquímica - Informações".

Trata-se de um boletim com frequência mensal, que veiculará notícias, informações e resumos de trabalhos e publicações relacionadas com a utilização do álcool etílico como matéria-prima para a indústria química. A distribuição do boletim é gratuito e, mais importante, permite a obtenção de cópia de um eventual documento lá resumido, bastando para isso fazer-se uma requisição ao CEPED/SDI, Rodovia BA-536, Km. 0, Caixa Postal 09, 42800 Camaçari BA.

Por outro lado, visando atender melhor as suas finalidades, "Alcoolquímica - Informações" aceita para publicação, a colaboração de todos os setores de pesquisa envolvidos no assunto.

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

Bridges, B.A.; Butterworth, B.E. & Weirstein, I.B., eds. - Indicators of genotoxic exposure. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, Banbury Report Series, 13, 576p., 1982. U\$ 75.00.

As constantes inovações tecnológicas realizadas pelo homem, embora possibilitem o progresso da humanidade poderão muitas vezes ocasionar danos inesperados. A transformação de substâncias naturais em novas formas de combinações são frequentemente acompanhadas por alterações não programadas, cujos efeitos não são previstos. Muitos produtos industriais têm demonstrado natureza altamente reativa e alguns deles podem interagir e causar alterações ao nosso material genético. Estas alterações podem ser causas de tumores, teratogênese e mutagênese. Muitos testes têm sido propostos para caracterizar a ação genotóxica de produtos químicos, testes estes realizados principalmente com ensaios microbiológicos e linhagens específicas de animais de laboratório e embora estes estudos sejam válidos como triagem, as extrapolações dos resultados para o homem são bastante problemáticas.

Este livro apresenta a compilação de conferências e respectivas discussões sobre estudos realizados visando monitorar diretamente os indivíduos expostos a riscos. A reunião foi realizada de 18 a 21 de abril de 1982 e nela foram tratados vários temas: epidemiologia do câncer, detecção de mutagênicos nos fluidos corporais, dano e reparo do DNA, citogenética, mutagênese, efeitos sobre as células germinativas. Efeitos de vários contaminantes ambientais e do fumo, são relatados. Uma grande diversidade de testes bioquímicos e genéticos são apresentados e discutidos quanto à sua aplicação e significado. Embora muitas vezes a metodologia analítica não seja descrita com todos os pormenores, pois não é esta a finalidade do trabalho, as fontes citadas são bastante atuais e abrangentes.

É um livro recomendado para quem se dedica ao estudo dos efeitos dos contaminantes ambientais sobre o homem, principalmente sobre as alterações de nosso material genético.

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

Majchrowicz, E. & Noble, E.P., eds. - Biochemistry and pharmacology of ethanol. New York, Plenum Press, vol. 2, 572p., 1979.

O volume 2 do livro intitulado "Biochemistry and pharmacology of ethanol",

editado por E. Majchrowicz & E.P. Noble, contém 27 capítulos distribuídos em 572 páginas. Cada capítulo é escrito por um ou mais especialistas que discorrem sobre o tema, de forma didática, concisa e sobretudo atualizada. Neste volume, o enfoque é dado principalmente aos aspectos bioquímicos dos efeitos farmacológicos do etanol, tratando desde sua interferência no equilíbrio ácido-base e hidroeletrolítico do organismo até sua interação com as substâncias endógenas e medicamentosas. As alterações comportamentais induzidas pelo etanol e fenômenos de dependência são igualmente discutidos em profundidade. Ademais, no final de cada capítulo, encontram-se numerosas referências bibliográficas que enriquecem ainda mais a obra.

O livro é recomendado aos profissionais: médicos, farmacêuticos e pesquisadores que trabalham em áreas relacionadas com a dependência etanólica.

Seizi Oga
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
Cidade Universitária
01000 São Paulo SP

Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Ações Básicas de Saúde. Divisão Nacional de Epidemiologia - Bases técnicas para programa de controle da poliomielite. Brasília, Ministério da Saúde, Série B: textos básicos de saúde, 5, 75p. il., 1982.

O livro pertence à série "Textos básicos de saúde" (número 5 da série B) e traz, como objetivo, as informações que foram consideradas como essenciais aos técnicos que, em qualquer nível de atuação, têm responsabilidade direta nas atividades de controle da poliomielite, em nosso país.

Após a introdução, há 5 capítulos onde a equipe de elaboração procurou cobrir este objetivo e, a seguir, a bibliografia.

O primeiro capítulo, "Aspectos epidemiológicos", se inicia com um breve histórico, faz um excelente resumo da epidemiologia da poliomielite e termina com uma descrição pormenorizada do comportamento desta doença no Brasil.

O segundo capítulo abrange os aspectos clínicos da infecção causada pelos poliovírus, com uma descrição minuciosa das formas paralíticas e do diagnóstico diferencial entre estas e a síndrome de Guillain-Barré e com os quadros clínicos causados pelos outros enterovírus.

No terceiro capítulo, são abordados aspectos do diagnóstico laboratorial, com maior ênfase aos procedimentos necessários para uma boa colheita de materiais, para a correta execução de provas e a interpretação dos resultados obtidos. Esta abordagem, em detrimento da parte da técnica virológica, salienta os pontos práticos mais importantes para o grupo que tem responsabilidade no programa de controle da poliomielite.

O quarto capítulo descreve a vacinação contra a poliomielite, quer em sua forma inativa (tipo Salk), quer quanto à vacina oral (tipo Sabin), sendo que maior ênfase é dada à última, pela grande utilização em nosso país. Aqui são discutidos pontos importantes, como as indicações, as contra-indicações e possíveis falhas de vacinação, além de descrever a estratégia empregada pelo Ministério da Saúde.

Finalmente, o quinto capítulo trata da vigilância epidemiológica, que está sendo executada e seus objetivos, dá a descrição detalhada das normas de notificação dos casos, a investigação epidemiológica executada, nos casos notificados e a análise dos dados das coberturas vacinais. Também são descritos os índices utilizados, sua interpretação e as ações corretivas necessárias.

No conjunto, este livro está muito bem impresso com raríssimos erros tipográficos e falhas. Podemos citar o esquecimento da referência bibliográfica no trabalho de Martins da Silva & Syvertton citado na página 14.

É um excelente texto, que contém as informações básicas, necessárias à orientação do grupo de técnicos de diversos níveis, que estão empenhados no controle de polio-

mielite no Brasil, mas que também poderá ser útil a outros profissionais interessados nos vários aspectos desta doença.

Oscar de Souza Lopes
Fundação Oswaldo Cruz FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365
Caixa Postal 926
20000 Rio de Janeiro RJ

Schenck, N.C., ed. - *Methods and principles of mycorrhizal research*. Minnesota, American Phytopathological Society, 243p., 1982. U\$ 24.00.

O conteúdo deste livro reflete muito bem seu título, ou seja, trata-se de uma coletânea de contribuições de trinta e nove autores norte americanos, de várias universidades ou instituições de pesquisa, cada qual especialista em uma área de micorrizas. Nestes artigos são revistos de uma maneira bastante breve os vários aspectos da pesquisa com micorrizas, com ênfase nas técnicas utilizadas e nos resultados obtidos, incluindo uma lista de referências bibliográficas que podem levar o leitor a fontes de informação mais detalhadas.

O livro é dividido em três partes: 1. Endomicorrizas, cobrindo desde a taxonomia dos fungos até métodos de avaliação e inoculação, produção de inóculo, e germinação de esporos; 2. Ectomicorrizas-taxonomia dos fungos, cultivo e preparo de inoculantes e metodologia geral de trabalho; 3. A terceira parte cobre aspectos gerais da pesquisa que podem envolver tanto endo como ectomicorrizas, como a pesquisa com radioisótopos, microscopia eletrônica e interação com outros microrganismos.

O livro *Métodos e princípios da pesquisa com micorrizas* pode ser recomendado para pesquisadores neste campo, bem como para estudantes que queiram se iniciar em seu estudo. Sua validade será extraordinária para quem pretende lecionar um curso que cubra os variados tipos e aplicações das micorrizas. A leitura é simples, concisa, apresentando algumas ilustrações de alta qualidade.

Elke J.B.N. Cardoso
ESALQ
Caixa Postal 9
13400 Piracicaba SP

Schimmel, P.R.; Söll, D. & Abelson, J.N. - *Transfer RNA: structure, properties and recognition*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, vol. 9A, 577p., 1979.

O livro aborda aspectos estruturais dos tRNAs; reconhecimento por proteínas e interação com ribossomos. Os textos são acompanhados de esquemas e vasta bibliografia. Finalmente, um apêndice reúne as sequências dos tRNAs conhecidos, a estrutura química das bases raras e informações estruturais das Aminoacil-tRNA Sintetasas.

As intensas investigações sobre tRNA a partir de sua descoberta por Hoagland em 1957, tem contribuído para um grande número de informações sobre sua estrutura e função. Sendo o menor ácido nucleico conhecido, contendo de 75 a 93 nucleotídeos e peso molecular em torno de 25.000, seu estudo é facilitado por métodos de alta precisão. Atualmente são conhecidos as sequências de 120 tipos de tRNA obtidos de diferentes fontes, os quais apresentam 4 aspectos comuns: a) a disposição das bases na molécula é em forma de folha de trevo. Neste modelo a molécula apresenta 4 braços que são formados pela aproximação da cadeia polinucleotídica através de pontes de hidrogênio entre as bases. A extremidade externa destes braços se dilatam devido à ausência de pontes, formando alças. Todos tRNAs possuem 4 braços: do aminoácido, da diidouridina do anticodon e da pseudouridina. Com exceção do braço do aminoácido os demais formam alças. Alguns tRNAs possuem um braço adicional, denominado de braço ou alça variável. b) a presença de nucleosídios raros é comum a todos tRNAs. c) certas regiões da molécula possuem sempre a mesma composição de bases "regiões invariáveis", enquanto outras ora apresentam uma purina, ora uma pirimidina "regiões semi-variáveis"; d) a estrutura tri-dimensional adquire a forma da letra "L", que implica num dobramento da cadeia polinucleotídica acomodando no braço maior do

"L" a alça do anticodon e da diidrouridina e no menor a alça da pseudouridina e os sítio do aminoácido. A estabilização do "L" é mantida pela formação de dupla hélice em cada um dos seus braços e por ligações de cátions bivalentes e poliaminas na molécula.

Mais recentemente, foram sequenciados tRNAs de cloroplastos e de mitocôndrias. Comparando-se estes com os de citoplasma, observa-se algumas diferenças em relação a posição de bases, porém a função desta variação não está esclarecida.

Quanto as suas funções, os tRNAs ocupam papel central na síntese de proteínas. Na 1ª etapa desta síntese, cada aminoácido enzimaticamente ao seu respectivo tRNA. As enzimas responsáveis por esta reação são as Aminoacil-tRNA Sintetasas que reconhecem com grande precisão o par aminoácido e tRNA. Existe uma enzima para cada aminoácido e a baixa frequência de erros na estrutura 1º das proteínas indica o perfeito reconhecimento. Estas enzimas apresentam grande variedade estrutural podendo ser desde simples monômeros até tetrameros e ao contrário dos tRNAs não são bem conhecidas estruturalmente, sendo este um fator limitante para se estabelecer os sítios de reconhecimento. Em relação aos tRNAs, modificações químicas podem ser causadas e seus efeitos são observados na reação de aminoacilação. Em algumas moléculas, modificações na região do anticodon não afetam a aminoacilação, o que implica no envolvimento de outras regiões no processo de reconhecimento.

Após a reação de aminoacilação, as etapas subsequentes da síntese protéica ocorrem nos ribossomos. As informações disponíveis sobre as interações entre tRNA e ribossomos são muito heterogêneas devido as dificuldades para se isolar o complexo tRNA-ribosoma que é instável e muito grande. Os ribossomos de *E. coli* (70 S) que são os mais conhecidos pesam 100 vezes mais que o tRNA e são compostos de 3 tipos de RNA ribossomais e 54 diferentes proteínas. Além destes componentes ribosomais, participam na síntese os fatores protéicos de iniciação IF-1, IF-2, IF-3; de elongação EF-TU, EF-G; e de liberação RF-1, RF-2, RF-3. Quanto aos sítios ocupados pelo tRNA os nos ribossomos é proposto a existência de pelo menos dois, que são chamados de Sítio Peptídil e Sítio Aminoacil que são ocupados simultaneamente durante o crescimento da cadeia peptídica. Algumas evidências indiretas mostram que tanto as proteínas como os RNA ribossomais interagem com o tRNA nestes sítios de maneira que o sítio do aminoácido liga-se à subunidade 50 S e a região do anticodon liga-se exclusivamente na subunidade 30 S onde interage com o RNA mensageiro pela ligação codon-anticodon. Devido ao grande número de elementos envolvidos na síntese a nível de ribossomos e a falta de conhecimento da estrutura terciária dos mesmos, torna-se difícil estabelecer as interações entre eles.

Neusa Maria Barbosa
Deptº de Bioquímica
Instituto de Biologia UNICAMP
Caixa Postal 1170
13100 Campinas SP

Systematic and Applied Microbiology, 4(1):1-154, Jan. 1983.

Trata-se de um periódico originário do desmembramento da tradicional publicação alemã "Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I - Abt. Originale, Series C".

A primeira publicação da série corresponde ao Volume 4, número 1. Anualmente serão publicados 4 números.

O periódico aceita trabalhos sobre Sistemática de microrganismos, Fisiologia e morfologia, Microbiologia aplicada à agricultura, Industrialização de alimentos, Microbiologia de esgotos e Ecologia microbiana.

De acordo com os editores, contribuições para publicação serão editadas no máximo em 5 meses após a aceitação final.

Pedidos de subscrição e envio de trabalhos podem ser endereçados para: Systematic

and Applied Microbiology, Gustav Fischer Verlag, P.O. Box 720143, Stuttgart 70,
German.

Ilvan Delgado Ricciardi
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Umezawa, H. & Hooper, I.R., eds. - Aminoglycoside antibiotics. New York,
Springer-Verlag, Handbook of experimental pharmacology, vol.62, 368p., 1982.
US\$116.80

Edited por H. Umezawa & I.R. Hooper e contando, principalmente, com a colaboração de vários outros pesquisadores japoneses, acaba de ser publicada valiosa contribuição ao estudo dos antibióticos pertencentes ao grupo dos aminoglicosídeos. O desenvolvimento da química dos carboidratos é que permitiu a síntese da estreptomicina, da kanamicina e de outros antibióticos desse grupo.

O presente livro consta de 7 capítulos. O primeiro, escrito pelo Prof. Irving R. Hooper constitui-se em apanhado histórico sobre este grupo de antimicrobianos, desde a famosa descoberta da estreptomicina, em 1944. A maioria desses antibióticos é produzida por actinomicetos. Outros são produzidos por amostras de *Micromonospora*. Solúveis em água, possuem largo espectro de atividade antibacteriana, incluindo principalmente amostras de *E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Enterobacter*. Com relação a *Pseudomonas*, é variável a atuação das mesmas. No capítulo seguinte, Umezawa & Tsuchiya assinalam que, até o presente momento, cerca de uma centena de aminoglicosídeos de origem microbiana foi sintetizada. Um estudo completo sobre a síntese e a química desses antibióticos é apresentada, com excelente literatura a respeito do tema em apreço. Derivados da gentamicina, por exemplo, são apresentados, com novas possibilidades terapêuticas, enriquecendo o arsenal terapêutico. O capítulo 3º cuida da biosíntese e da mutasíntese dos aminoglicosídeos, principalmente da estreptomicina, neomicina, kanamicina, paromomicina, espectinomicina, gentamicina, ribostamicina, sisomicina e tobramicina. Outros antibióticos desse grupo estão sendo utilizados em veterinária e na agricultura. Microrganismos dos gêneros *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Nocardia*, *Micromonospora*, *Streptoalloteichus* e algumas espécies de *Bacillus* estão envolvidos na biosíntese dos aminoglicosídeos. Mutantes desses germes podem ser úteis na produção de antibióticos desse grupo, envolvendo o "trabalho" de plasmídeos. No capítulo 4º, Mitsuhashi estuda a atividade antibacteriana dos antibióticos aminoglicosídeos, principalmente contra bactérias produtoras dos fatores R, transferíveis entre diversas espécies da família *Enterobacteriaceae*. Tanaka estuda, a seguir, o mecanismo de ação desses antibióticos que geralmente se comportam como bactericidas. No entanto, na conclusão, o autor nos mostra ser ainda um mistério o mecanismo através do qual esses agentes destroem as diversas células bacterianas a eles sensíveis. O mecanismo de resistência das diversas bactérias a esses antibióticos é tratado no Cap. 6, envolvendo enzimas que alteram a permeabilidade da célula procariótica envolvida no processo. O último capítulo cuida da toxicologia e farmacologia dos antibióticos aminoglicosídeos, principalmente sua atividade nefrotóxica e ototóxica. Extensa literatura no final de cada capítulo.

O presente livro retrata o imenso trabalho desenvolvido por pesquisadores japoneses no fascinante campo dos antibióticos.

Carlos da Silva Lacaz
Instituto de Medicina Tropical USP
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar,
470
05403 São Paulo SP

Weiss, R.; Teich, N.; Varmus, H. & Coffin, J., eds. - RNA tumor viruses. 2.ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 1396p., 1982.

O livro "The Molecular Biology of Tumor Viruses" é uma publicação do dinâmico "Cold Spring Harbor Laboratory" editado por John Tooze do "Imperial Cancer Research Fund". Trata-se da primeira edição de 1973; no semestre passado fizemos a apreciação da fantástica 2ª edição (Revista de Microbiologia, 14(3):229-230, 1983.). Assim, sinto-me numa situação peculiar, porém tratarei de dissociar as publicações.

O texto é composto por 13 (treze) capítulos e na ocasião de sua publicação representou uma obra extraordinária, de fibra, a única no gênero escrita com singular propriedade, pois, a matéria é de alta complexidade. Segundo o editor, algumas coleções dos cursos de verão que são anualmente ministrados em Cold Spring Harbor, que aliás já se tornaram tradicionais, assim como roteiros foram aperfeiçoados e constituem alguns capítulos.

O capítulo 1 traz a descrição das origens da pesquisa contemporânea em vírus tumorais, em que a definição de câncer assim se inicia: "... Given the existence of so many types of multicellular organisms, each with its unique patterns of differentiation, there are likely to exist many, many molecular pathways along which these signals are transmitted. Any of them in turn may fail and lead to one of the many abnormal forms of growth that collectively are called Cancer. Cancer, thus, is not a unitary category but a wide, to some, hopelessly wide collection of different abnormal conditions, each displaying its own specific properties".

O capítulo 2 "The culture of mammalian cells" é altamente relevante, pois a cultura de células e tecidos constitui-se o sistema modelo para experimentação, discute-se com minúcias as peculiaridades de cada sistema celular. É fartamente ilustrado com figuras de cultura de células normais e após infecção por vírus tumorais. Além disso, inclui 9 (nove) tabelas contendo as informações essenciais com a respectiva referência bibliográfica.

O capítulo 3, "The external surfaces of cells in culture" é na realidade um estudo pormenorizado da membrana no aspecto da biologia molecular. O conhecimento da membrana é de inofismável significação, pois, é preciso que se entenda por que uma célula tem um determinado tipo de célula como vizinha. O desafio é justamente elucidar o mecanismo que leva a perda da inibição por contacto.

Os capítulos 4, 5, 6 e 7 tratam do vírus de polioma, SV40 e papiloma em seus diferentes aspectos: estrutura, composição química, ciclo lítico, transformação e genética. Os autores mostram as dificuldades de se estudar os papilomas devido à inexistência de um sistema que apresente efeitos citopáticos regulares. Além disso, uma discussão ampla e compreensiva da transformação abortiva é apresentada. As características dos diferentes mutantes temperatura sensíveis seja por testes de complementação ou função gênicas são detalhadamente apresentados.

O capítulo 8, "The Adeno-vírus", vírus respiratórios do homem mostram oncogenicidade para roedores. Relata a possibilidade da formação de híbrido adeno-vírus com SV40 que certamente constitue um impecilho experimental.

O capítulo 9, "Herpesviruses", trata-se dos mais controvértidos, aponta as evidências iniciais ligando herpes com câncer em sapos, camundongos e macacos. Atualmente, fortalecem as ligações entre certos tipos de herpes e cancer na espécie humana.

Os capítulos 10, 11, 12 e 13, "The RNA tumor viruses" abordam com fluência os aspectos de morfologia, composição química, replicação, transmissão e genética dos vírus tumorais RNA do tipo-C. O capítulo 10 fartamente ilustrado com 11 figuras e 14 tabelas apresenta uma síntese das propriedades gerais dos vírus tanto de aves como de mamíferos (murinos, felinos, hamsters e macacos). O capítulo 11, discute a replicação dos vírus não defectivos. O ponto alto do capítulo é a transcriptase reversa apresentada com abordagem simples, altamente compreensiva, e plena de referências bibliográficas. A enzima constitui queda do dogma central da biologia molecular. Acentua o fato de que cada partícula deve conter 10 moles da enzima, que é absolutamente necessária, porém não suficiente para um vírus RNA ser oncogênico. O capítulo 12, "Genetic transmission of RNA tumor viruses" considera a transmissão vertical e horizontal. Acentua que algumas aves possuem genoma viral na forma de DNA, que não se expressa como vírus, mas pode ser responsável pela presença do an-

tígeno grupo-específico. Os vírus endógenos podem ser ativados por agentes físicos e/ou químicos e liberar partículas infecciosas.

O capítulo 13 , "Genetics of RNA tumor viruses" apresentada na ocasião como sendo um aspecto ainda na "infância". A abordagem apresentada é a do isolamento de mutantes que podem ser caracterizados fisiologicamente e geneticamente. São analisados os mutantes condicionais que mantêm sua fisiologia em condição permissiva, o que permite a identificação da função gênica. O caráter defectivo é discutido em todos os vírus conhecidos.

Em vista do exposto, sinto-me em condição de indicar o texto como fundamental para os iniciantes na biologia molecular dos retrovírus, pois, traz uma análise sucinta dos vários aspectos dos vírus tumorais com extraordinária propriedade colo-cando inclusive alguns quesitos que foram solucionados e incluídos na 2.ed. (1982). Evidentemente, os aspectos genéticos são incompletos visto no panorama atual, porém, na ocasião da publicação as observações eram efetuadas sob outro prisma. É assim, um livro indispensável em qualquer biblioteca dos virologistas ao lado da fantástica, porém complexa 2.ed. dada a peculiaridade da matéria.

Tomoko Higuchi
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

VOLUME 14 JANEIRO-MARÇO 1983 NÚMERO 1

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

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

VOLUME 14 ABRIL-JUNHO 1983 NÚMERO 2

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 Karin Gisela Frey & 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 Corynebacterium</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 imundifusão 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, Pará</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		

VOLUME 14 JULHO-SETEMBRO 1983 NÚMERO 3

Maria Lúcia Rácz José Alberto Neves Candeias & Edna Lilian Lira Capeletti	157	Definição de soros padrões brasileiros para a pesquisa de anticorpos contra a rubéola	<i>Definition of Brazilian Standard sera for titration of rubella antibodies</i>
Maria de Lourdes Monteiro da Silva Isabel C. Affonso Scaletsky & Lúcia Helena Viotto	161	Ausência de produção de citotoxina entre amostras enteropatogênicas de <i>Escherichia coli</i> isoladas em São Paulo, Brasil	<i>Non production of cytotoxin among enteropathogenic strains of <i>Escherichia coli</i> isolated in São Paulo, Brazil</i>
Luis Antonio Mathias Dilemundo Perecim & Aramis Augusto Pinto	163	Análise quantitativa de três provas sorológicas utilizadas no diagnóstico da brucelose bovina: comparação entre animais não vacinados e animais vacinados com <i>B. abortus</i> amostra B19	<i>Quantitative analysis of three serological tests utilized in the diagnosis of bovine brucellosis: comparison between unvaccinated cattle and <i>Brucella abortus</i> strain 19 vaccinated cattle</i>
Luiza Helena da Silva Melo Cavalcanti Ricardo Fernandes Maia Edeltrudes de Oliveira Lima & Lauro Xavier Filho	168	Atividade anti-microbiana "in vitro" da atranorina	<i>In vitro antimicrobial activity of atranorine</i>
Luiz Carlos Duarte Formiga Thereza Cristina Ferreira Camello Ana Luiza de Mattos Guaraldi Lylian Badaue de Almeida Rangel & Angela Cristina F.C. Blois de Assis	172	Teste de fluorescência e pesquisa da atividade pirazina-carboxilamidase (Pyz) na identificação do bacilo diftérico atoxinogênico	<i>The U.V. fluorescence test and the pyrazin carboxylamidase activity as screening tests for identifying the non-toxigenic diphtheria bacilli</i>
Ernesto Hofer	174	Primeiro isolamento e identificação de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> no Brasil de infecção gastrointestinal humana	<i>The first isolation and identification of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> from human gastrointestinal infection in Brazil</i>

Claudia E.O. Pires de Campos Regina M.S. Tosoni Decarlis & Evanil Pires de Campos	176	Aspectos microbiológicos de bactérias isoladas de pacientes com infecções pulmonares agudas tratadas pela tobramicina	<i>Microbiological features of bacterial infection of lung from patients treated by tobramycin</i>
Maria Eunice Monaco Furletti & Alcides Serzedello	183	Determinação de carboidratos em micélio de <i>Rozites gongylophora</i>	<i>Determination of carbohydrates in mycelium of Rozites gongylophora</i>
Angela Maria Werneck & Paulo Pinto Contijo Filho	187	Quantificação na degradação de heptadecano e hexadecano por micobactérias através da cromatografia líquido-gasosa	<i>Gas-liquid chromatography quantification of heptadecan and hexadecan degradation by mycobacterias</i>
Luiz Antonio Graciolli José Renato de Freitas & Alaides Puppin Ruschel	191	Bactérias fixadoras de nitrogênio nas raízes, caules e folhas de cana-de-açúcar (<i>Saccharum sp.</i>)	<i>Nitrogen fixing bacteria isolated from roots, stems and leaves of sugarcane (<i>Saccharum sp.</i>)</i>
Maria Cristina Dantas Vanetti Daison Olzany Silva & Arnaldo Chaer Borges	197	Caracterização, teor proteico e aminoácidos essenciais de quatro culturas de <i>Bacillus</i> isoladas de vinhaça represada	<i>Characterization, protein and essential aminoacids contents of four isolates of <i>Bacillus</i> from distillery slops pond</i>
Armando Augusto Henriques Vieira	202	Purificação de culturas do fitoplâncton com solução de Dakin	<i>Purification of phytoplankton cultures with Dakin's solution</i>
Walderez Gambale Adhemar Purchio & Claudete Rodrigues Paula	204	Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil	<i>Action of abiotic factors on airborne fungi in the city of São Paulo, Brazil</i>
Maria das Graças Silva Yassca Kassai Moreira & Eduardo Osório Cisalpino	215	Flora fúngica do ar e do piso no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil	<i>Fungic flora in the air and floor at the "Hospital das Clínicas" of the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil</i>
Informação Técnico-Científica SBM	223		

VOLUME 14 OUTUBRO-DEZEMBRO 1983 NÚMERO 4

Maria Cristina D. Vanetti Daison O. Silva & Arnaldo C. Borges	233	Crescimento de bactérias do gênero <i>Bacillus</i> em vinhaça suplementada ou não com ureia e fosfato de sódio	<i>Growth of Bacillus in distillery slops with urea and sodium phosphate supplementation</i>
Evanil P. Campos Osvaldo G. Brasil & Cláudia E.O.P. Campos	239	Ação de antimicrobianos sobre o componente respiratório de bactérias	<i>Effect of antimicrobial agents on the respiratory component of bacteria</i>
Renate Schoebitz & L. Montes	247	Viabilidad de diferentes cepas bacterianas en cuatro diluyentes de uso frecuente	<i>Viability of different bacterial strains in four commonly used diluents</i>
Maria de Lourdes M. da Silva Marília A. Yamamoto & Norma P.F. Severo	254	Resistência a drogas, lisogenia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas	<i>Drug resistance, lisogeny and production of colicin and hemolysin among enteropathogenic Escherichia coli strains</i>
Vanete Thomaz Glaci T. Zancan & Shigehiro Funayama	259	Regulação dos níveis de desidrogenase lática em <i>Dactylyium dendroides</i>	<i>Regulation of L-lactate levels in Dactylyium dendroides</i>
Clara P. Mendonça Carlos Solé-Vernin & Maurício A. Nogueira	265	Ocorrência de Estreptococos beta-hemolíticos dos grupos A (e seus tipos T); C e G em escolares de Araraquara SP, setembro de 1979	<i>The occurrence of groups A (and its T types) C and G of beta-hemolytic streptococci in school children in Araraquara SP, Brazil, September 1979</i>
Heriberto Fernández & Laura Otth	273	Sensibilidade in vitro de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> a seis drogas antimicrobianas	<i>In vitro susceptibility of Neisseria gonorrhoeae to six antimicrobial drugs</i>
Maria I. Sato Petra S. Sanchez & Maria Therezinha Martins	276	Isolamento de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica em água e esgoto de São Paulo, Brasil	<i>Isolation of enterotoxigenic Escherichia coli in water and sewage in São Paulo, Brazil</i>

Marina B. Martinez Roberto A.A. Moura Elsa M. Mamizuka Maria de Fátima B. Pavan & Laércio R. Porto Jr.	282	Flora anaeróbia vaginal de mulheres sem infecção genital aparente	<i>Anaerobic bacteria from the vagina of women without apparent gynecological infection</i>
Ernani S. Sant'Anna & Eugênio Aquarone	285	Licor sulfítico (licor negro) como substrato para o crescimento de <i>Candida utilis</i> : estudo experimental	<i>Sulphite liquor as a medium for the growth of <i>Candida utilis</i></i>
Nilma C. Leal Ernesto Hofer Marinalva F. Costa & Agenor T. de Sá	290	Isolamento de <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> de líquido cefalorraquidiano, em Recife, Pernambuco	<i>Isolation of <i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> from cerebrospinal fluid, in Recife city, Brazil</i>
Informação Técnico-Científica SBM	292		

Fotótipos e Impressão



Avenida Boa Vista, 84
Vila das Moças São Paulo
Fone: 3149-2233
CEP 04288



