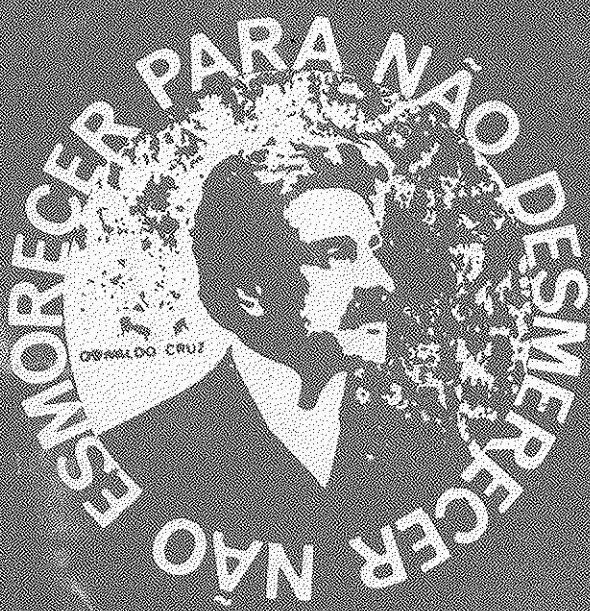


Revista de Microbiologia



GWALDO CRUZ

SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 15 Número 4 Out.-Dez. 1984

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 duplícata (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 ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Berger'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 Berger deverá ser mencionada entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações pressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc: sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

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

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



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

São Paulo — Brasil

Conselho Diretor	Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo
Diretor Executivo	João Salvador Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP
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 Jpão S. Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Secretário Geral Maria Therezinha Martins CETESB Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 05459 São Paulo SP
	Vice-Presidente Paulo Pinto Gontijo Filho Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ	Tesoureiro Milton Mangini 01000 São Paulo SP
Objetivos	A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agrupar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.	

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios
Coca-Cola Indústrias Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares
Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Henkel S.A. Indústrias Químicas

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 15 OUTUBRO-DEZEMBRO 1984 NÚMERO 4
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 15(4)

CONTEÚDO

	CONTÉUDO	CONTENTS
Montelli, A.C.	193 Antibioticoterapia racional - contribuição da microbiologia clínica	Rational antibiotic therapy - contribution from clinical microbiology
Costa, S.O.P. da; Bianco, M. & Bonato, M.C.M.	202 Ação de alguns agentes curagênicos na perda da excreção de protease em <i>Proteus mirabilis</i>	Effects of some curing agents on the loss of protease excretion of <i>Proteus mirabilis</i>
Andrade, L.M. de; Batista, A. de M.; Camurati, C.; & Marsico, A.G.	209 Decréscimo da população bacteriana eliminada por pacientes com tuberculose pulmonar tratados com esquema de curta duração	Decrease of bacterial population of pulmonary tuberculous patients treated by short course chemotherapy
Antunes, G.S.; Damasceno, C.A.V. & Cisalpino, E.O.	217 Perfil de susceptibilidade de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> a antimicrobianos em Belo Horizonte, MG	Pattern of susceptibility of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> against antimicrobials in Belo Horizonte area
Nunes, M.P.; Toledo, M.R.F. de; Trabulsi, L.R. & Ricciardi, I.D.	222 Invasibilidade e enterotoxigenicidade de <i>Yersinia enterocolitica</i> e das espécies atípicas de <i>Yersinia</i> isoladas do homem e de cães no Brasil	Invasion and enterotoxin production by <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> and atypical <i>Yersinia</i> isolated from humans and dogs in Brazil
Cauduro, P.F.; Mezzari, A. & Dias, C.A.G.	227 Conjuntivite por <i>Neisseria lactamica</i>	Conjunctivitis due to <i>Neisseria lactamica</i>
Teixeira, L.M.; Suassuna, I.R. & Suassuna, J.	231 Resistência a antimicrobianos em amostras de <i>Shigella</i> isoladas no Rio de Janeiro	Antimicrobial susceptibility tests in <i>Shigella</i> strains isolated in Rio de Janeiro
Andrade, J.R.C.; Caniné, G.A.; Parentoni, L.S. & Santa Rosa, M.R. de	239 Pili e aderência para ✓ células HeLa em <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas	Pili and adherence to HeLa cells in enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC) from outbreaks cases of infantile enteritis

Magalhães, F.M.M. & Döbereiner, J.	246 Ocorrência de <i>Azospirillum amazonense</i> em alguns ecossistemas da amazônia	Occurence of <i>Azospirillum amazonense</i> in some amazonian ecosystems
Castro, R.	253 Estudio comparativo de las pruebas bioquímicas empleadas para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos	Comparative study of the biochemical test used to determine <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> in foods
Purchio, A.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Ugolini, C. & Remie, C.A.	258 Fungos anenófilos da Baixada Santista, Estado de São Paulo, Brasil	Airborne fungi of Baixada Santista, State of São Paulo, Brazil
Muro, M.A. de; Park, Y.K. & Carioca, J.O.B.	266 Produção de etanol a partir de farinha de babaçu, através da fermentação alcoólica não convencional	Production of ethanol from raw babassu starch by a nonconventional fermentation method
Informação Técnico-Científica SBM	272	
Hungate, R.E.	278 Bioquímica e microbiologia da digestão anaeróbia	Biochemistry and microbiology of anaerobic digestion

ANTIBIOTICOTERAPIA RACIONAL - CONTRIBUIÇÃO DA MICROBIOLOGIA CLÍNICA

Augusto Cezar Montelli*

Deptº de Clínica Médica
Faculdade de Medicina de Botucatu
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP, Brasil

Considerações Preliminares

A história natural da antibioticoterapia se baseia no princípio da ação seletiva de substâncias capazes de destruir alguns germes, mas não a todos, sem destruir as células do hospedeiro ou a vida do homem. A plena aplicação deste princípio ocorreu com a introdução das sulfanilamidas em uso clínico em 1936, a descoberta da penicilina por Alexander Fleming (1928) e sua produção comercial a partir de 1941. Uma nova era no âmbito da medicina se delineou, uma verdadeira revolução na capacidade de se tratar com sucesso os pacientes com doença infecciosa.

A partir de então, grande número de outras drogas antimicrobianas foram descobertas, uma parcela das quais teve aplicabilidade em terapêutica, modificando de maneira profunda a abordagem e a evolução dos processos originados por agentes biológicos suscetíveis. O impacto destas drogas sobre a maioria das infecções bacterianas é bem conhecido.

Entretanto, nos últimos anos a antimicrobiano-terapia tornou-se mais complexa e uma série de deficiências na sua atuação foram constatadas e ampliadas. A lista dos patógenos humanos expandiu-se, não somente com a caracterização de novos germes, mas também com o reconhecimento da participação de organismos com baixo potencial invasivo como agentes de severas infecções oportunistas, sobretudo em pacientes imunocomprometidos hospitalizados. Também, entre os agentes patogênicos mais frequentes, a evolução continuada de novos modelos de resistência aos antibióticos e quimioterápicos aporta para o clínico sérias dificuldades. Entre uma série de fatores conhecidos e outros ainda por se definir, essa resistência que os germes desenvolveram às drogas se coloca em destaque, como fator decisivo do insucesso terapêutico observado no correr dos últimos 40 anos.

Por outro lado, o desenvolvimento de novos antibióticos semi-sintéticos, a ampla utilidade dos métodos de monitorização do nível de drogas antimicrobianas administradas e de outros métodos laboratoriais microbiológicos, possibilitam uma elevação na segurança e na efetividade da antibioticoterapia praticada racionalmente em nossos dias.

Para uma abordagem abrangente e coerente do processo infeccioso, há que se considerar, então, fatores múltiplos relacionados com o paciente, com o agente etiológico e com a droga a ser utilizada em seu combate. Da compreensão adequada de tais fatores e de sua interação depende a geração de uma antibioticoterapia eficaz, objetivo maior da atuação médica no campo das infecções.

Nesta publicação, dada a complexidade da terapêutica antimicrobiana, nos limitamos a abordar, apenas aspectos relacionados com a definição etiológica do processo infeccioso e com a sensibilidade bacteriana a drogas, campo de atuação da microbiologia clínica.

* Membro da Comissão de Análise do Sistema COBA SBM-MSD.

Definição etiológica da infecção

O primeiro fundamento do tratamento de paciente com infecção continua sendo a definição etiológica do processo. Esta pode ser presumida com grande margem de segurança, em várias situações, apenas pelos dados clínico-epidemiológicos e alguns exames complementares (entre os quais se destacam o hemograma e o exame radiológico). Entretanto, para a maioria das infecções há necessidade de exames laboratoriais mais específicos, como exames bacteriológico ou micológico diretos, cultura qualitativa ou quantitativa, exames sorológicos, etc. Muitos erros e fracassos lamentáveis ocorrem e prejudicam o paciente pela falta de solicitação ou impossibilidade de execução de exames adequados; por se considerar o diagnóstico clínico como insuperável ou suficiente em muitas situações; por falta de recursos econômicos ou laboratoriais ou por se confiar em demasia no antibiótico que se prescreve.

Vários tipos de vírus (sarampo, varicela, caxumba, rubéola), de infecções micóticas (candidases, tinhos) ou bacterianas (erisipela, escarlatina) são bons exemplos de situações em que o diagnóstico etiológico pode ser razoavelmente presumido apenas clinicamente. Outras doenças, por outro lado, demandam a realização de cultura ou outras técnicas mais sofisticadas (contraimunoeletroforese, imunofluorescência, vários tipos de testes sorológicos, provas micológicas ou virológicas): meningite purulenta, septicemias, endocardites, broncopneumonias, infecção urinária, infecção intestinal, etc.

Por causa do frequente atraso entre a suspeita ou reconhecimento clínico de uma infecção e a utilização dos dados bacteriológicos, a terapêutica inicial, muitas vezes, necessita ser instituída. Neste caso deverá ser baseada em evidências iniciais, derivadas da avaliação global do paciente como um hospedeiro. Este enfoque proporcionará informação sobre o impacto da infecção no indivíduo e, frequentemente, ajuda a focalizar a atenção para patógenos específicos.

O risco de certas infecções ocorrerem é aumentado por numerosos defeitos subjacentes nos mecanismos de defesa do hospedeiro. Exemplos incluem: diminuição da mobilização de leucócitos para os locais de trauma pela administração de etanol; aumento do risco de meningococcemia ou gonococcemia em pacientes com deficiência nos últimos componentes do complemento; reativação de tuberculose após realização de gastrectomia; ocorrência de grave otite externa em pacientes com diabetes melito, etc. Uma variedade de outros determinantes do hospedeiro influenciam não apenas a predisposição particular à infecção, como também podem se constituir em fatores desencadeantes ou agravantes do processo infecioso e interferir na resposta à terapia antimicrobiana, bem como, influir na probabilidade de ocorrência de efeitos adversos: hospitalização; administração de corticosteroides, imunossupressores ou antimicrobianos; transplantes; irradiação; utilização de sondas ou catéteres; próteses; neoplasias; colagenoses; alterações da imunidade humoral e/ou celular; idade; estado nutricional, etc.

Uma vez estabelecida a importância da definição etiológica da infecção, cabe analisar a participação do laboratório microbiológico no estabelecimento da mesma:

- Considerando a grande variedade e especificidade dos testes microbiológicos, torna-se fácil entender que o laboratório deve sempre trabalhar baseado em hipótese(s) etiológica(s) formulada(s) para o caso. Nesse sentido, a comunicação adequada entre o médico e o laboratorista se torna de grande importância, uma vez que nenhum dos métodos disponíveis isola todos os microrganismos patogênicos conhecidos, nem os diferencia dos não patogênicos.
- A escolha de determinado exame microbiológico deve sempre levar em conta a fase da doença suspeitada, pois, dependendo da mesma haverá maior probabilidade de sucesso com o uso de determinado teste. Um bom exemplo disso se encontra na febre tifóide, onde a hemocultura se constitui no exame de eleição durante a primeira semana de doença e a coprocultura ou a reação de Widal são seletivos durante e após a 2a. semana.
- Para escolha do material que seja representativo da lesão, se impõe orientação segura do paciente. Assim, deve-se colher escarro e não saliva; secreção purulen-

ta das lesões subjacentes e não do espaço fistuloso; "swab" das bordas das feridas e não de sua superfície; urina da primeira micção da manhã, preferencialmente, fezes diarréicas com elementos patológicos visíveis (muco, pus ou sangue) e líquidas.

- Vários cuidados devem ser observados na coleta do material clínico: a amostra deverá ser obtida em quantidade suficiente, antes que antimicrobianos sejam administrados e sob condições rigorosas, que evitem contaminação (cuidados de assepsia e equipamento estéril); existem técnicas padronizadas de acordo com o material a ser colhido.
- A manutenção ou o transporte do material coletado, influí decisivamente na recuperação do agente infeccioso, caso a semeadura dos meios de cultura não possa ser efetuada de imediato. Assim, devemos manter o líquor em temperatura de 37°C e não refrigerá-lo (o frio desencadeia o processo enzimático que leva a lise dos meningococos, por exemplo); recomenda-se que o sangue seja coletado diretamente nos meios de cultura líquidos, levados até onde se encontra o paciente; a urina pode permanecer na geladeira, no máximo, até o dia seguinte à coleta; as fezes devem ser colocadas em tubos com salina glicerinada tamponada, etc.
- A semeadura do material clínico se processará em meios de cultura cuja escolha levará em conta as informações prestadas pelo médico: hipótese(s) etiológica(s); se a cultura é para controle de tratamento; se houve suspeita de contaminação durante a coleta, etc. O mesmo se diga em relação ao exame microscópico direto (à fresco, corado pelo Gram ou por outros corantes).
- Por outro lado, cabe ao microbiologista clínico evitar a tentação de prover mais completa e acadêmica avaliação das amostras clínicas recebidas. Sua missão fundamental será a de gerar informação útil para os cuidados do paciente, tão rapidamente quanto possível. Assim, um relato imediato da presença de leucócitos e bactérias com certas características ao Gram, pode ser mais útil para os cuidados médicos do que um relato preciso de espécies e seus respectivos antibiogramas, 2 a 3 dias após. Informações bacteriológicas refinadas, utilizando identificação por meio bioquímico, sorológicos, fagotipagem, etc. propiciam importantíssimos dados, mais de natureza epidemiológica do que de emprego clínico imediato, uma vez consideradas as necessidades prementes do paciente agudamente infectado e o tempo necessário para a obtenção daquelas informações.

O laboratório pode contribuir também para a ineficácia do tratamento antimicrobiano em várias situações: quando a amostra clínica estudada foi obtida de local que não corresponde ao foco da infecção; quando os microrganismos isolados correspondem a germes saprófitas ou são contaminantes; quando amostras para cultivo ou os métodos microbiológicos usados são insuficientes; quando se focaliza a terapêutica contra um único germe, o predominante na cultura, sendo a infecção mista e em geral associada com bactérias anaeróbicas.

Alguns conceitos, frequentemente confundidos e envolvendo resultados das culturas, merecem nossa atenção, sobretudo pela sua implicação prática na conduta a ser tomada frente ao paciente infectado:

Colonização - Aparecimento ou aumento significativo do número de qualquer agente potencialmente patogênico na micro-flora-residente, após início da antibioticoterapia. Exemplo: usando-se penicilina G para tratamento de amigdalite estreptococcica, ocorre aparecimento de bastonetes gram-negativos na cultura de controle, porém, sem evidência de qualquer sinal clínico de infecção.

Superinfecção - Evidência clínica e microbiológica de uma nova infecção que não tem relação com o uso de antibióticos e que aparece como complicação de outras doenças infecciosas ou não. Exemplos: broncopneumonia bacteriana durante o sarampo; infecção por fungos em doenças linfogranulomatosas malignas ou no diabete melito.

Supra-infecção - Evidência clínica e microbiológica de nova infecção, ou seja, de infecção por outro agente, que se desenvolve durante o uso de antibióticos para tratamento de infecção anterior. Exemplo: supuração pulmonar por *Klebsiella*, após pneumonia por *Staphylococcus aureus* tratada com penicilina.

Para haver supra-infecção é preciso que haja, inicialmente, colonização por um agente potencialmente patogênico.

A experiência clínica tem comprovado que, no primeiro caso (colonização), a melhor conduta é não ministrar antimicrobianos, ao contrário das duas últimas condições caracterizadas, nas quais se impõe antibioticoterapia racionalmente conduzida. Depreende-se deste fato a importância da contribuição laboratorial para a adequada definição dessas situações, fundamental para a escolha de conduta eficaz.

Determinação da sensibilidade dos microrganismos às drogas

Como a indicação racional para o uso clínico de antimicrobianos não é feita para combater uma doença, mas sim para combater determinado *germe* envolvido no processo infecioso, uma vez definido o agente da infecção, a indicação da droga adequada ao tratamento do paciente seria muito fácil e segura, caso todos os germes apresentassem sensibilidade constante às drogas. É o que se observa, por exemplo, com *Streptococcus pyogenes*, *Brucella*, *Mycoplasma*, *Salmonella typhi*, *Treponema*, etc. em nosso meio. Entretanto, a maioria dos agentes mostra variação de sensibilidade, apresentando-se grande número deles com resistência múltipla e de alto nível (em mcg/ml), envolvendo a quase todas as drogas disponíveis para a antibioticoterapia. Esta variabilidade é característica de algumas bactérias altamente prevalentes, como *S. aureus* e *S. faecalis*, entre os gram-positivos; enterobactérias (*Salmonella*, *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, etc.) e *Pseudomonas aeruginosa* entre os gram-negativos.

Assim, o estabelecimento do diagnóstico etiológico nem sempre será suficiente para administração correta do antimicrobiano, sendo necessário conhecer a sensibilidade "in vitro" do germe isolado para orientar adequadamente a seleção do mais eficaz. A realização do antibiograma tem sua indicação mais precisa nos casos com grave quadro clínico e/ou envolvendo germes de sensibilidade sabidamente variável e, portanto, imprevisível!

Mas, mesmo a realização procedente do antibiograma pode fornecer dados falsos ou inúteis em algumas condições:

- quando os parâmetros a serem obedecidos para a correta execução do antibiograma pelo sistema dos discos (técnica de Kirby-Bauer) apresentam falhas: composição do meio de cultura, concentração de droga e durabilidade dos discos, pH e atmosfera de incubação, concentração do inóculo bacteriano, leitura e interpretação dos halos de inibição produzidos pelas drogas testadas;
- quando os resultados prognosticam abaixo da real utilidade clínica da droga para determinado caso; uma vez que os pontos estabelecidos para caracterizar sensibilidade são, geralmente, correlacionados com níveis de droga obtidos no sangue, um germe que se mostre resistente a dado antimicrobiano por este método pode, na verdade, ser sensível a níveis de droga obtidos na urina, quando a mesma é nela excretada em sua forma ativa;
- quando os resultados do antibiograma prognosticam indicações acima da real utilidade clínica de um antibiótico, exemplo: *Salmonella* pode mostrar sensibilidade a uma variedade de antimicrobianos "in vitro", quando apenas a ampicilina, o cloranfenicol e a associação sulfametoazol + trimetoprim são realmente efetivos "in vivo".

Quando o laboratório microbiológico não efetua o antibiograma dentro destes preceitos ou quando o clínico não está consciente das possibilidades de erro anteriormente enumeradas, poderá selecionar um medicamento ineficaz para tratamento de seu paciente. Por exemplo, emprego de nitrofurânicos para combater germes isolados das vias respiratórias; da neomicina para aqueles das vias urinárias ou o ácido nalidíxico para os de vias biliares. Também poderá valorizar o encontro de bactérias saprófitas ou colonizantes e procurar eliminá-las com drogas a que se mostrarem sen-

síveis "in vitro": estreptococos viridantes e *S. epidermidis* isolados de vias aéreas; *Serratia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* ou *Pseudomonas*, das fezes, etc.

Estas expectativas são, lamentavelmente, confirmadas pelas análises preliminar e a evolutiva dos resultados do Sistema COBA, implantado com o objetivo de gerar informações sobre germes isolados nos laboratórios clínicos do país e de sua sensibilidade às drogas antimicrobianas. As informações fornecidas pelos laboratórios integrantes do Sistema, em 1980 (época em que não haviam ainda recebido normas técnicas de execução do antibiograma e definição dos germes de drogas a se considerar), mostraram seu uso indiscriminado e pouco criterioso, envolvendo com frequência bactérias da microbiota normal ou germes com padrão de sensibilidade sabidamente constante e, portanto, previsível. Por outro lado, várias inadequações na execução do método foram constatadas, como exemplificam os seguintes fatos: número excessivo de drogas empregadas por exame, uso indevido de antimicrobiano, segundo a bactéria testada ou o material clínico de origem das amostras; drogas do mesmo grupo utilizadas simultaneamente e apresentando resultados diferentes; detecção de elevada proporção de amostras sensíveis em grupos bacterianos reconhecidamente resistentes a certas drogas, ou de amostras resistentes em germes de conhecida sensibilidade.

No período de 1981 a 1983 (com os laboratórios de informação devidamente cientes das normas técnicas) observou-se, em geral, manutenção de uma série de impropriedades, quando se analisam os resultados em sua globalidade, apresentando-se apenas alguns laboratórios com informações aparentemente confiáveis. Dados de natureza evolutiva da sensibilidade das bactérias às drogas, exemplificam com propriedade os fatos mencionados (Tabela 1).

Conclui-se, assim, que o antibiograma incorretamente executado ou mal interpretado, pode conduzir o médico à conduta inadequada frente ao paciente infectado com todas as possíveis implicações desastrosas para o homem e o ambiente de previsibilidade possível e combate necessário.

O problema crucial com que a antibioticoterapia se defronta em nossos dias, está totalmente relacionado ao fenômeno da resistência bacteriana a drogas, detectado em todas as partes do mundo, em maior ou menor intensidade, sobretudo nos ambientes hospitalares. Para se atingir a atual situação, além da incorreta e abusiva utilização de antibióticos e quimioterápicos na área médica, há que se considerar também o uso de drogas antimicrobianas em rações alimentares de animais, em produtos destinados à agricultura e à veterinária. Desta forma, entre outras poluições em que vive o homem, pode-se considerar mais esta: a poluição ambiental por antibióticos!

Numerosos estudos vêm registrando no Brasil e no exterior, elevação nas taxas de resistência às drogas em microrganismos envolvidos nos processos infecciosos. Nossa experiência em Botucatu, acumulada desde 1966, demonstra o mesmo fenômeno. Estudando amostras bacterianas isoladas de material clínico dos pacientes do H.C. da Faculdade de Medicina de Botucatu, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), utilizando meio de cultura sólido adicionado de droga, pudemos observar:

- Entre 374 bactérias enteropatogênicas isoladas de pacientes com diarréia no período 1966-1976 - Elevadas proporções de amostras resistentes, sobretudo em *E. coli* O₁₁₁ e *Salmonella typhimurium* (Tabela 2);
- Em 1400 amostras urinárias isoladas de pacientes com bacteriúria significativa, no período de 1968-1977 - Proporções variáveis de cepas resistentes, segundo a bactéria considerada, predominando em *P. aeruginosa*, *Proteus indol* (+) e *Klebsiella* sp. (Tabela 3);
- Em 592 amostras de *S. aureus* isoladas de 1970-1978 - Cepas resistentes, isoladamente, a todas as drogas testadas, em proporções mais elevadas e com tendência, em geral, para aumento progressivo no período 1977-1978 (Figura 1).

À medida que se constata elevação na resistência das bactérias às drogas, concomitantemente é observada diminuição dos germes produtores de

Tabela 1 - Sensibilidade de bactérias às drogas

Bactérias	Drogas	% de amostras resistentes		
		1980-1981	1982	1983
<i>E. coli</i>	ácido nalidíxico	10	8	7
<i>E. coli</i>	cefoxitina	10	5	1
<i>S. aureus</i>	cloxacilina	47	46	23
<i>P. aeruginosa</i>	carbenicilina	53	52	39
<i>P. aeruginosa</i>	polimixina	16	10	3

novos antibióticos, o que conduz a uma perspectiva futura sombria, caso medidas destinadas a prolongar a vida útil das drogas em uso não sejam colocadas em prática!

Tabela 2 - Distribuição percentual das amostras resistentes de germes enteropatogênicos, de acordo com as drogas e os grupos ou tipos sorológicos das bactérias (Botucatu, 1966-1976)

Droga	Bactéria	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella</i> outras	Total	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Salmonella</i> outras	Total	<i>E.coli</i> 0111	<i>E.coli</i> outras	Total
Sulfadiazina		98	97	97	86	76	84	98	81	92
estreptomicina		34	60	53	86	47	78	66	52	61
Tetraciclina		36	39	38	88	59	82	94	83	90
Cloranfenicol		25	14	17	83	41	74	94	65	84
Canamicina		20	15	16	80	41	71	94	48	79
Ampicilina		0	2	1	85	41	75	77	30	61
Cefalotina		0	1	0,5	64	29	57	23	13	20
Fosfomicina		0	12	11	0	0	0	-	-	-
Gentamicina		0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ácido nalidíxico		4	1	2	76	56	71	10	10	10

Resistência bacteriana a drogas

Alguns grupos ou espécies bacterianas são originalmente resistentes a certos antibióticos, caracterizando a denominada resistência natural a drogas. Ao que parece, este tipo de resistência depende, na maioria das vezes, da impermeabilidade das superfícies externas da célula bacteriana aos antimicrobianos em questão. Por não mostrar consequências consideráveis na prática da antibioticoterapia, não tem se constituído em motivo de maiores preocupações e, em consequência, vem sendo pouco investigada, em comparação com os demais tipos de resistência conhecidos. São exemplos clássicos de resistência natural: a dos bastonetes gram-negativos à benzil-penicilina; a dos gram-positivos às polimixinas; e das *Pseudomonas* às cefalosporinas de primeira geração; a do bacilo da tuberculose ao cloranfenicol, etc.

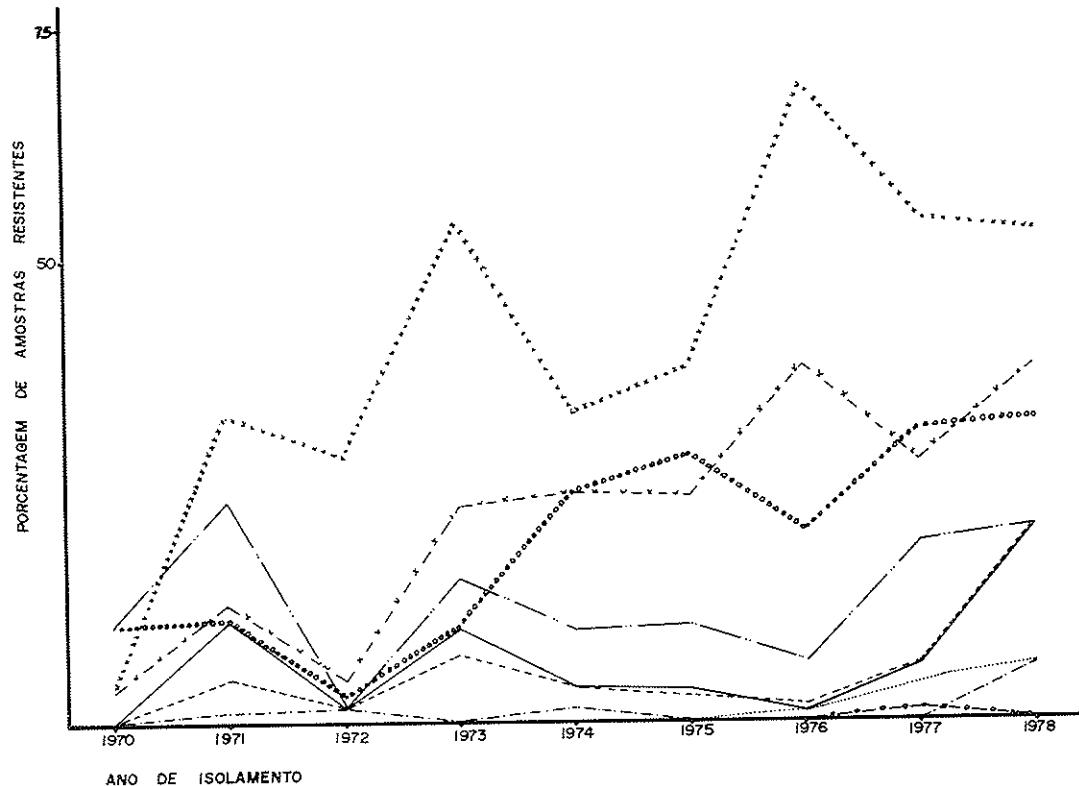
A resistência adquirida a drogas, que considera a resistência como uma propriedade adquirida pela bactéria originalmente sensível, é a que vem restringindo a utilidade dos antimicrobianos e trazendo atualmente sérias preocupações, dada a influência crescente e restritiva que vem determinando no uso clínico eficaz dos antibióticos e quimioterápicos. Uma vez que o nível da resistência adquirida (em mcg/ml) comumente se apresenta superior à concentração que a droga atinge no local da infecção, infere-se facilmente o obstáculo em que se constitui tal fenômeno ao bom êxito da antibioticoterapia. Outro aspecto agravante diz respeito à resistência múltipla apresentada pela maioria dos germes envolvidos, conferindo-lhes condições de não se deixar atacar por duas ou mais drogas simultaneamente, além daquelas proximamente relacionadas.

Tabela 3 - Distribuição percentual das amostras urinárias resistentes, de acordo com a droga e o grupo bacteriano (Botucatu, 1968-1977)

Droga	Bactéria	<i>E.coli</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Proteus indol(+)</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Sulfadiazina		84	99	99	99	100	100
estreptomicina		23	29	29	13	44	75
Tetraciclina		73	78	58	99	99	100
Cloranfenicol		52	69	31	33	60	90
Canamicina		30	51	26	27	44	91
Ampicilina		49	94	83	46	74	99
Cefalotina		16	45	81	6	74	100
Fosfomicina		11	95	9	4	39	54
Gentamicina		0	7	1	1	0	37
Carbenicilina		37	97	50	33	47	53
Ácido nalidíxico		11	14	8	2	20	-

Figura 1 - Distribuição porcentual das amostras resistentes de *S. aureus*, segundo o ano de isolamento e as drogas

Simblos: xxx = tetraciclina; -...- = cloranfenicol; -x- = canamicina; ooo = estreptomicina; — = ampicilina; --- = penicilina; -.- = oxacilina; ... = gentamicina; -o- = cefalotina



Este tipo de resistência é decorrência primária de alteração no genoma da célula, de natureza cromossômica ou extra-cromossômica.

A resistência cromossômica ocorre espontaneamente, em consequência da mutação que pode atingir todas as bactérias patogênicas ou da microbiota normal para qualquer droga. A prática mostrou, entretanto, que mutantes resistentes a certas drogas são obtidos com maior facilidade e que os níveis de resistência adquiridos pelas mutantes, dependem em grande parte da droga. Assim, observa-se a resistência adquirida em um único passo, que pode determinar elevados níveis de resistência a uma droga (100, 1000mcg/ml ou mais), implicando eritromicina, estreptomicina, ácido nalidíxico, novobiocina, etc.; a resistência dos bacilos da tuberculose se constitui em bom exemplo desse fenômeno. Em outras situações, para que a bactéria se torne mais resistente, são necessárias várias mutações na mesma célula (ou linhagem celular), para a mesma droga, sendo os níveis de resistência atingidos geralmente baixos (10mcg/ml), o que caracteriza a resistência por múltiplos passos, envolvendo às penicilinas, tetraciclinas, cloranfenicol, etc. e diferentes germes.

Se o antibiótico, para o qual houve desenvolvimento de resistência cromossômica, for utilizado haverá pressão seletiva, consistindo na eliminação da população selvagem sensível e proliferação da população de bactérias resistentes. As infecções causadas por esses germes não responderão à terapêutica pelo antibiótico implicado. Por esta razão, a teoria explicativa para o desenvolvimento da resistência a drogas é denominada de mutação-seleção.

Há pelo menos duas razões pelas quais a resistência mediada cromossomicamente é de menor influência na prática da antibioticoterapia:

- determinantes cromossômicos da resistência não podem participar da disseminação para diferentes gêneros ou espécies;
- bactéria mutante é, com frequência, defectiva metabolicamente e apresenta desvantagem em crescimento seletivo, quando comparada às amostras sensíveis.

Desse modo, a resistência mediada por plasmídios se constitui no principal mecanismo responsável pela perda progressiva da eficácia das drogas antimicrobianas no combate aos processos infeciosos. Os plasmídios são partículas de DNA extracromossómico que codificam apenas resistência, podendo ser encontrados em bastonetes gram-negativos (plasmídios R), *S. epidermidis*, *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *S. faecalis*. Os plasmídios podem ser transferidos por meio de conjugação (processo sexuado, segundo o qual a célula macho portadora do elemento genético extracromossómico diferencia fimbrias, pelas quais se estabelece a comunicação entre os citoplasmas das células bacterianas conjugantes e o fator se transmite à célula receptora), transdução (mediada por bacteriófago, bastante eficiente na passagem de plasmídios pequenos; de grande importância entre os gérmenes gram positivos, que com algumas exceções não mostram o processo da conjugação), transformação (transferência direta de DNA entre bactérias), transposição (transferência de determinantes de resistência de um plasmídio para outro, para um cromossomo ou para um fago; o elemento transponível - transposon ou "gens saltadores" - cria o seu próprio local de inserção e nenhuma homologia é necessária entre os replicons doador e receptor).

Assim, as resistências a drogas antimicrobianas determinadas por plasmídios podem ser disseminadas através de vários mecanismos, conjugativos e não conjugativos. De qualquer maneira, a pressão seletiva devida ao uso de drogas é muito importante, uma vez que as resistências codificadas nos plasmídios estão geralmente associadas com resistência cruzada para drogas não relacionadas estruturalmente. O uso de drogas tende a dirigir para seleção de resistência a drogas não relacionadas. Os microrganismos que adquirem os plasmídios R podem ser comensais não patogênicos, patógenos oportunistas ou patógenos essenciais. Os oportunistas, tais como *Pseudomonas* ou *Klebsiella*, requerem antibióticos para sobreviverem, ao passo que os patógenos essenciais se disseminam na ausência de antibióticos, podendo gerar epidemias como as determinadas por *Shigella dysenteriae* (na América Central) ou *S. typhi* (no México).

Outros fenômenos que interferem com a antibioticoterapia

Dois outros fenômenos, diferentes da resistência e sem qualquer comprovação de implicação genética, também influem nos resultados do uso de antimicrobianos para o tratamento de processos infeciosos bacterianos:

1. *Persistência* - Pode ser definida como a capacidade de um germe sobreviver à exposição a uma droga nos tecidos, apesar de se mostrar sensível à mesma "in vitro". Corresponde a um simples problema de fuga de algumas células bacterianas à agressão exercida pelo antibiótico. Pode ocorrer persistência quando a bactéria se achar protegida por fatores ambientais a nível do tecido (condições de anaerobiose, pH, eletrólitos ou produção de enzimas inativadoras de antibióticos), exemplo - presença de *Neisseria gonorrhoeae* sensíveis à penicilina G na uretra, protegida pela penicilinase secretada por *S. epidermidis* da flora local, quando o paciente é tratado da uretrite com penicilina G. Em muitos casos, o fenômeno se desenvolve graças ao aparecimento de formas "indiferentes" das bactérias nos tecidos, tais como formas L, protoplastos ou formas metabolicamente inativas, exemplo - transformação de *E. coli* em "forma L" ao nível dos rins em processos de pielonefrite, persistindo frente a drogas utilizadas no tratamento e que atuam sobre a parede celular; as "formas L" podem reverter à forma patogênica original de *E. coli* quando as condições lhe favorecem, podendo deste modo, participar de recaídas de infecções.

2. *Tolerância* - Fenômeno conhecido desde 1975 entre amostras de *S. aureus*, pode ser entendido como uma sensibilidade do germe às Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos antibióticos, mas uma elevada resistência às Concentrações Bactericidas

Mínimas (CMB) dos mesmos antibióticos, "in vitro". Assim, a tolerância se expressa por uma CMB muitas vezes superior à CIM, após 24 horas de incubação. A bactéria tolerante parece estar deficiente em enzima autolítica, necessária para bacteriolise, após exposição a drogas ativas contra a parede celular (penicilinas, cefalosporinas, vancomicina). Foi registrada por Sabath & col. (10) em 44% das amostras de *S. aureus* estudadas. A "resistência" ao tratamento vem sendo notada em endocardites, bacteremias ou em pacientes imunodeprimidos.

As considerações anteriores, abordando aspectos da definição etiológica do processo infecioso e do fenômeno da resistência bacteriana a drogas, permitem caracterizar a relevante contribuição atual da microbiologia clínica no intrincado processo da antibioticoterapia racional.

Referências Bibliográficas

1. Acor, J.F. & Sabath, L.D. - Bacterial persistance in vivo: resistance or tolerance to antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 14:86-91, 1978.
2. Eliopoulos, G.M. & Moellering Jr., R.C. - Principles of antibiotic therapy. *Med. Clin. N. Amer.*, 66:3-15, 1982.
3. Gavon, T.L. - In vitro antimicrobial susceptibility testing. *Med. Clin. N. Amer.*, 58:493-503, 1974.
4. Grieco, M.H. - Antibiotic resistance. *Med. Clin. N. Amer.*, 66:25-37, 1982.
5. Montelli, A.C. - Infecção intestinal por enterobactérias: aspectos etiológicos e da sensibilidade a drogas. *Ciência e Cultura*, 29:(supl.):773, 1977.
6. Montelli, A.C. - *Staphylococcus aureus*: aspectos epidemiológicos, da fagotipagem e da sensibilidade a drogas relacionados a amostras isoladas no Município de Botucatu, SP (1970-1978). Botucatu, Faculdade de Medicina de Botucatu, 1981. (Tese de Livre-Docência).
7. Montelli, A.C. - Resistência bacteriana em hospitais do Brasil: Sistema COBA. Anais do Simpósio Internacional sobre Resistência Bacteriana e Infecções Mistas, p.57-61, 1982.
8. Montelli, A.C. & Pinho, S.Z. - Avaliação bacteriológica de infecção urinária. *Ciência e Cultura*, 32:(supl.):74, 1980.
9. Rocha, H.; Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. - Antibiograma. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 3:51-60, 1972.
10. Sabath, L.D.; Wheeler, N.; Laverdiere, M.; Blazevic, D. & Wilkinson, B.J. - A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 1:443-447, 1977.
11. Suassuna, I. - Noções gerais e incidência de resistência bacteriana. Anais do Simpósio Internacional sobre Resistência Bacteriana e Infecções Mistas, p.7-16, 1982.
12. Trabulsi, L.R. - Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. *Rev. Microbiol. (São Paulo)* (supl. especial), p.30, 1973.

AÇÃO DE ALGUNS AGENTES CURAGÊNICOS NA PERDA DA EXCREÇÃO DE PROTEASE EM *PROTEUS MIRABILIS*

Sérgio Olavo Pinto da Costa

Deptº de Biologia
Instituto de Biociências USP
Caixa Postal 11461
01000 São Paulo SP, Brasil

Marisa Bianco

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

& Maria Christina Manhães Bonato

Laboratório de Genética
Universidade Federal da Paraíba
Campus Universitário
58000 João Pessoa PB, Brasil

Resumo

Drogas curagênicas, como brometo de etídio, acriflavina e mitomicina C, aumentam, grandemente, a conversão de células excretoras de protease instáveis de *Proteus mirabilis* em células não excretoras. Esse efeito não ocorre sobre células excretoras estáveis de protease. A rifampicina apenas seleciona células protease-negativas, por eliminação preferencial de células excretoras. Temperaturas superiores à fisiológica não são efetivas na perda de excreção de protease em linhagens de *P. mirabilis* que excretam protease de maneira instável.

Summary

Effects of some curing agents on the loss of protease excretion of Proteus mirabilis

Treatment with some curing agents such as ethidium bromide, acriflavine and mitomycin C causes increased occurrence of non-excreting protease cells in unstable *Proteus mirabilis* strains but not in stable ones. Rifampicin only selects non-excreting cells because the excreting-cells are more sensitive to it. High temperature (44°C) has no effect on the conversion of P⁻ from P⁺ cells.

Introdução

Proteus mirabilis produz somente uma enzima proteolítica (protease) extracelular (23).

O estudo de indivíduos isolados mostrou que algumas amostras de *P. mirabilis* têm

a capacidade de excretar protease como um caráter estável, onde todos ou a maioria dos indivíduos excretam protease (colônias P⁺). Contudo, algumas amostras excretam essa enzima como um caráter instável (10), ou seja, grande número de indivíduos da população não excreta protease (colônias P⁻). Assim, é possível postular a existência de linhagens estáveis e instáveis de *P. mirabilis*, em termos de excreção de protease. Existem evidências de que a informação genética, responsáveis pela síntese de protease, é de origem extracromossômica (9).

No presente trabalho, pretende-se demonstrar a ação curagênica de vários agentes, como brometo de etídio, rifampicina, acriflavina, mitomicina C e da elevação da temperatura, sobre o caráter protease de *Proteus mirabilis*.

Material e Métodos

Amostras bacterianas - As amostras bacterianas usadas e suas propriedades mais relevantes são mostradas na Tabela 1. As amostras de *P. mirabilis* da série L chegaram a nosso laboratório, logo após o isolamento. As demais amostras estavam estocadas em nosso laboratório ou no de origem, por períodos de tempo prolongados. As linhagens excretoras de protease são representadas por P⁺ e as não excretoras por P⁻.

Meios de cultura - A composição dos meios de cultura (Difco) é dada em gramas por litro de água destilada. NA, Bacto-Nutrient Agar, NB, Bacto-Nutrient Broth, NG, Bacto Blood-Agar Base, adicionado de 7,5g de Bacto-Gelatin e 10g de Bacto-Agar.

Prova de hidrólise da gelatina segundo Frazier (13) modificado - Bactéria, crescida em meio NB, por uma noite a 37°C, é semeada em placas contendo meio NG, para produção de colônias isoladas. Após incubação por uma noite a 37°C, as colônias P⁺ são detectadas, cobrindo-se a superfície do meio de cultura com solução saturada de sulfato de amônio (May & Baker, Ltd.) por um período de aproximadamente 25 minutos. As colônias, circundadas por um halo transparente, indicando a produção de protease, que digere a gelatina contida no meio, são consideradas protease-positivas (P⁺).

Tratamento pelo brometo de etídio (EB) de linhagens de *Proteus mirabilis* instáveis e estáveis quanto à excreção de protease - A técnica utilizada foi baseada em Bouanchaud & col. (4). A partir de uma solução-estoque de EB em caldo nutritivo, pH 7,2 ($1,26 \times 10^{-2}$ M), foram preparadas duas séries de tubos (13 x 130mm), dotados com tampa de rosquear e contendo volume final de 1,0ml. A diferença de concentração, de um tubo para outro, foi de 100µg e as concentrações variaram de $1,26 \times 10^{-3}$ M a $3,78 \times 10^{-3}$ M. Cada tubo recebeu inóculo correspondente a 10^4 células, de cultura crescida por 16-18 horas, a 37°C, após o que, as séries de tubos em duplicata foram incubadas a 37°C por 24-30 horas.

Aliquotas, representativas de cada concentração, foram convenientemente diluídas em solução salina 0,15M, semeadas e espalhadas em placas contendo meio NG. Após incubação por 12-18 horas, procedeu-se à contagem diferencial de colônias P⁺ e P⁻, com auxílio do teste de precipitação da gelatina do meio de cultura, com solução de sulfato de amônio saturada. Foram ensaiadas as linhagens instáveis N-17 e N-4 e as estáveis N-17-11 e N-17-12.

Cerca de 50 colônias P⁻ resultantes do tratamento da referida droga, foram cultivadas em NB por 24 horas a 37°C e reexaminadas, para confirmação do fenótipo.

Tabela 1 - Amostras bacterianas utilizadas.

Símbolos: (a) = Laboratório da Santa Casa de Curitiba, PR; (b) = Instituto Adolfo Lutz

Amostras	Características	Origem
N-4 e N-17	Instável. Isoladas de material clínico humano	N.P. de Souza (a)
N-17Gm	Instável. Originada da N-17	Este trabalho
N-17-11 e N-17-12	Estáveis. Originadas da N-17 P ⁺	Este trabalho
L-68m	Instável. Isolada de material clínico humano	G.V.A.Pessoa (b)
L-68-1-P ⁺	Colônia P ⁺ estável isolada da L-68m	Este trabalho

Tabela 2 - Perda da excreção de protease em linhagens protease-ins-táveis de *Proteus mirabilis* pelo tratamento com brometo de etídio (EB).

Símbolos: (a) = Linhagens referidas na Tabela 1; (b) = Cerca de 50 colônias P⁺ resultantes do tratamento pela droga, foram cultivadas em NB e reexaminadas para confirmação dos fenótipos

Linha-gens(a)	Exp. nº	Conc. de EB (M)	Cel. viáveis/ml	Cols. testadas	Cols. p-(b)	(%)
N-17	1	3,52x10 ⁻³	0	0	0	0
		3,27x10 ⁻³	2,9x10 ⁷	482	446	92,5
		3,02x10 ⁻³	5,0x10 ⁷	325	325	100,0
		2,77x10 ⁻³	2,5x10 ⁷	510	403	79,0
		0	2,5x10 ¹⁰	680	191	28,1
	2	3,02x10 ⁻³	0	0	0	0
		2,77x10 ⁻³	1,8x10 ⁷	355	326	91,8
		2,52x10 ⁻³	2,1x10 ⁷	700	620	88,6
		0	3,1x10 ⁹	510	130	25,5
	3	2,52x10 ⁻³	0	0	0	0
		2,26x10 ⁻³	2,6x10 ⁶	1047	620	59,2
		1,76x10 ⁻³	2,2x10 ⁷	773	773	100,0
		1,26x10 ⁻³	1,7x10 ⁷	773	640	82,8
		0	3,0x10 ⁹	805	300	37,3
N-4	1	3,52x10 ⁻³	0	0	0	0
		3,27x10 ⁻³	1,6x10 ⁷	1894	1894	100,0
		2,77x10 ⁻³	2,8x10 ⁷	1033	1033	100,0
		2,26x10 ⁻³	3,6x10 ⁷	1711	1711	100,0
		0	1,8x10 ⁹	1400	100	7,1
	2	3,60x10 ⁻³	0	0	0	0
		3,52x10 ⁻³	2,9x10 ⁶	1671	1600	95,8
		3,27x10 ⁻³	2,0x10 ⁷	2033	1580	77,7
		2,77x10 ⁻³	4,0x10 ⁷	3100	1330	42,9
		2,26x10 ⁻³	2,9x10 ⁷	1800	620	34,4
		0	2,1x10 ⁹	1800	120	6,7

Tabela 3 - Perda da excreção de protease em linhagens protease-es-táveis de *Proteus mirabilis* pelo tratamento com brometo de etídio (EB).

Símbolos: (a) = Linhagens referidas na Tabela 1; (b) = Cerca de 50 colônias P⁺ resultantes do tratamento pela droga, foram cultivadas em NB e reexaminadas para confirmação dos fenótipos

Linha-gens(a)	Exp. nº	Conc. de EB (M)	Cel. viáveis/ml	Cols. testadas	Cols. p-(b)	(%)
N-17-11	1	3,52x10 ⁻³	0	0	0	0
		3,27x10 ⁻³	1,8x10 ⁶	1337	65	4,9
		2,27x10 ⁻³	2,7x10 ⁷	2020	120	5,9
		2,26x10 ⁻³	3,1x10 ⁷	1994	30	1,5
		0	3,6x10 ⁹	2000	0	0
	2	3,52x10 ⁻³	0	0	0	0
		3,27x10 ⁻³	6,0x10 ⁶	890	12	1,3
		2,27x10 ⁻³	5,0x10 ⁷	1700	0	0
		2,26x10 ⁻³	4,8x10 ⁷	1010	8	0,8
		0	2,3x10 ⁹	980	0	0
N-17-12	1	3,60x10 ⁻³	0	0	0	0
		3,52x10 ⁻³	1,0x10 ⁵	1182	12	1,0
		3,27x10 ⁻³	1,5x10 ⁶	1720	6	0,3
		2,27x10 ⁻³	1,9x10 ⁷	1300	3	0,2
		2,26x10 ⁻³	2,7x10 ⁷	990	0	0
		0	1,9x10 ⁹	2010	0	0
	2	3,52x10 ⁻³	0	0	0	0
		3,27x10 ⁻³	8,0x10 ⁶	1090	0	0
		2,27x10 ⁻³	7,0x10 ⁷	3008	0	0
		3,26x10 ⁻³	8,0x10 ⁷	1710	0	0
		0	4,3x10 ⁹	1720	0	0

Determinação da atividade do EB sobre o crescimento bacteriano de amostras instáveis e estáveis - A Concentração Mínima Inibitória de EB foi determinada utilizando-se diluições em série do corante em NA e expressa em molaridade (27).

Ação da rifampicina no aparecimento de células P⁺ em linhagens de *Proteus mirabilis* instáveis e estáveis, quanto à excreção de protease - Duas séries de 10 tubos, cada um contendo 1,0ml de NB, foram adicionadas de rifampicina (50 e 5µg/ml) no primeiro tubo de cada série e submetidas a diluições sucessivas e múltiplas de dois. Cada série teve um de seus tubos isentos da droga, a fim de servir como controle. Inoculou-se, ainda, em cada tubo, aproximadamente 10⁵ células provenientes de cultura recente (12 horas a 37°C). Assim feito, os tubos foram incubados a 37°C, por 24 horas sem agitação. O conteúdo de cada tubo, correspondente a diferentes concentrações da droga e controle sem a droga, foi semeado em placas contendo NG e incubadas por uma noite, a 37°C. A diferenciação entre células P⁺ e P⁻ foi feita com o auxílio da solução saturada de sulfato de amônio.

Tabela 4 - Ação da acriflavina no aparecimento de células P⁻, em linhagens de *Proteus mirabilis* estáveis e instáveis quanto à excreção de protease.

Símbolos: (a) = Linhagens referidas na Tabela 1. A linhagem L-68 é instável em relação à excreção de protease. A linhagem L-68-1-P⁺ é relativamente estável; (b) = Colônias P⁻ obtidas pela ação da acriflavina, foram submetidas a transferência pela técnica do carimbo de Lederberg & Lederberg (19) em meio NG sem a droga e a seguir retestadas para o referido caráter

Linhagens (a)	Conc. (mg/ml)	Cels. viá- veis(p/ml)	Colônias testadas	Cols. P-(b); (%)
L-68m	0	2,0x10 ⁹	880	60 6,8
	0,019	3,7x10 ⁷	925	88 9,5
	0,039	1,8x10 ⁶	678	100 14,7
	0,078	3,3x10 ⁴	715	418 58,5
	0,156	1,2x10 ³	148	80 54,1
	0,312	2,4x10 ³	234	232 99,1
L-68-1-P ⁺	0	3,0x10 ⁹	1100	6 0,5
	0,019	3,1x10 ⁹	1870	4 0,2
	0,039	2,7x10 ⁸	890	0 0
	0,078	1,8x10 ⁶	2010	1 0,04
	0,156	1,4x10 ⁴	780	0 0
	0,312	2,7x10 ³	520	0 0

Tabela 5 - Efeito da mitomicina C no aparecimento de células P⁻ em linhagens de *Proteus mirabilis* instáveis e estáveis quanto à excreção de protease.

Símbolos: (a) = Linhagens referidas na Tabela 1. A linhagem L-68 é instável em relação à excreção de protease. A linhagem L-68-1-P⁺ é relativamente estável para esse caráter

Linhagens (a)	Conc. (mg/ml)	Cels. viá- veis(p/ml)	Colônias testadas	Cols. P-(b); (%)
L-68m	0	1,7x10 ⁹	480	31 6,5
	0,5	1,6x10 ⁹	714	77 10,8
	1,0	1,7x10 ⁷	670	105 15,7
	1,5	5,1x10 ⁵	1850	1850 100,0
	2,0	3,1x10 ²	135	135 100,0
L-68-1-P ⁺	0	4,0x10 ⁹	780	3 0,4
	0,5	1,0x10 ⁹	765	0 0
	1,0	2,3x10 ⁷	1036	8 0,8
	1,5	2,8x10 ⁵	900	2 0,2
	2,0	6,2x10 ³	180	0 0

Tratamento de linhagens estáveis e instáveis quanto à excreção da protease de *Proteus mirabilis* pela mitomicina C (MC) - Culturas de linhagens estáveis e instáveis, desenvolvidas por uma noite a 37°C, foram diluídas 100 vezes em meio LB (30ml) e submetidas à agitação (160 por minuto) até atingir $1,2 \times 10^8$ células por ml (aproximadamente 5 horas). O inóculo foi preparado diluindo-se essa cultura, de modo a conter cerca de 10^3 células em 0,1ml. Esse inóculo foi adicionado em tubos contendo mitomicina C, nas concentrações de 2,0, 1,5, 1,0 e 0,5µg/ml. Esse sistema foi então incubado por 48 horas e submetido a contagem diferencial de células P⁺ e P⁻ pela técnica do sulfato de amônio.

Ação da acriflavina (AF) no aparecimento de células P⁻ em linhagens de *Proteus mirabilis* estáveis e instáveis quanto à excreção de protease - Nove tubos contendo concentrações decrescentes de AF a partir de 5 até 0,039mg/ml em NB (volume final 1,0ml) foram inoculados com aproximadamente 10^7 células de cultura desenvolvida por uma noite a 37°C. Após incubação por 24-48 horas, a 37°C e sem agitação, aliquotas de cada tubo foram examinadas para viabilidade e diferenciação de células P⁺ e P⁻, em meio NG, pela técnica da solução de sulfato de amônio saturada.

Tratamento pela elevação da temperatura de cultivo de linhagens de *Proteus mirabilis* - Culturas desenvolvidas por uma noite a 37°C serviram de inóculo para 30ml de NB (10^6 células por ml). Cada amostra foi incubada em diferentes temperaturas (37, 40, 42 e 44°C) em banho dotado de agitação reciprocante (100 por minuto, por 24 horas). Aliquotas foram retiradas, diluídas e semeadas por espalhamento, em placas NG e incubadas por 18-24 horas, a 37°C. O teste diferencial entre células P⁺ e P⁻ foi feito com o emprego da solução saturada de sulfato de amônio.

Resultados

A frequência espontânea de células P⁻ pode ser grandemente aumentada pela ação de brometo de etídio (Tabela 2). As células estáveis (N-17-11 e N-17-12) não sofrem uma eficiente ação curagênica desse corante (Tabela 3).

Tabela 6 - Ação da rifampicina no aparecimento de células P⁻, em linhagens de *Proteus mirabilis* instáveis e estáveis quanto à excreção de protease.

Símbolos: (a) = Linhagens referidas na Tabela 1. A linhagem L-68 é instável em relação à excreção de protease e a L-68-1-P⁺ é relativamente estável. Colônias P⁻ obtidas pela ação da rifampicina, foram submetidas a transferência pela técnica do carimbo de Lederberg & Lederberg (19) em meio NG sem a droga e a seguir retestadas para o referido caráter.

Linhagens (a)	Exp. nº	Conc. (mg/ml)	Cels. viá- veis(p/ml)	Cols. testadas	Cols. P ⁻	(%)
L-68m	1	0	1,9x10 ⁹	788	280	35,5
		0,31	1,1x10 ⁹	453	195	43,0
		0,62	1,4x10 ⁹	331	258	77,9
	2	1,24	1,7x10 ⁹	893	890	99,7
L-68-1-P ⁺	1	0	2,8x10 ⁹	210	80	38,1
		0,78	1,4x10 ⁹	440	328	74,5
		1,56	1,7x10 ⁹	472	432	91,5
		3,12	4,6x10 ⁸	1700	1700	100,0
	2					

A acriflavina atua eficientemente na conversão de células P⁺ em P⁻, quando amostras instáveis são utilizadas. Embora as células estáveis não apresentem menor sensibilidade à sua ação, não se observa a referida conversão (Tabela 4). O mesmo acontece com o uso da mitomicina C (Tabela 5). Já com a rifampicina, apesar de mostrar um aparente efeito conversor de células P⁺ em P⁻ em células instáveis, não se mostra esse efeito em relação às células estáveis que, por sua vez, são muito mais sensíveis à ação do antibiótico. Isso faz crer tratar-se de efeito seletivo, onde células P⁻ tiram vantagem sobre as P⁺ (Tabela 6).

Temperaturas superiores à fisiológica (Tabela 7), não parecem ter um significativo efeito no aparecimento de células P⁻ e na viabilidade de células instáveis, em relação ao caráter protease.

Discussão

A conversão de células P⁺ em P⁻, de linhagens instáveis de *Proteus mirabilis*, é grandemente aumentada pela ação de alguns agentes curagênicos. No caso de linhagens estáveis, essa conversão é muito menor ou mesmo não acontece.

O brometo de etidio (EB) é um poderoso agente de cura (4), sempre presente ao lado dos corantes de acridina quando se pretende "eliminar" plasmídios ou caracterizar elementos extracromossómicos. Sua ação sobre os ácidos nucleicos e polimerases do DNA e RNA (30), sua ação intercalante entre pares de bases (20) e os seus efeitos bioquímicos sobre bactérias colocam-no como agente preferencial no estudo de plasmídios.

O processo de cura pelo EB, em amostras de *P. mirabilis* instáveis, foi muito eficiente, atingindo, algumas vezes, 100%. Esse efeito só foi conseguido numa estreita faixa de concentração, onde a variação foi de $1,26 \times 10^{-3}$ M a $3,78 \times 10^{-3}$ M o que corresponde a uma concentração alta, quando se sabe que, entre as enterobactérias, concentrações de $6,0 \times 10^{-5}$ M e $2,5 \times 10^{-3}$ M, para o mesmo número de células usadas neste trabalho, são suficientes (4).

Aparentemente ocorreu um processo de cura, já que a Concentração Mínima Inibitória do EB foi a mesma para amostras instáveis e estáveis.

Os corantes de acridina são muito eficientes na "cura" do fator F (14). As acridinas apresentam pouco, se algum efeito na eliminação de plasmídios R (24, 31). A eliminação de plasmídio F pelas acridinas parece ser devida a interferência seletiva na replicação do plasmídio (15, 32).

Conforme se verifica na Tabela 4, a acriflavina aumenta o número de células P⁻ de uma população instável, porém não o faz numa população estável, embora as células dessa população P⁺ apresentem o mesmo nível de sensibilidade à droga.

A concentração necessária para esse efeito variou de 78µg a 312µg/ml, bem maior do que a encontrada na literatura para outras bactérias gram-negativas (1, 27).

A rifampicina, um derivado da rifamicina (21), tem se mostrado eficiente em eliminar plasmídios.

Tabela 7 - Tratamento pela elevação da temperatura de cultivo, das linhagens de *Proteus mirabilis* instáveis quanto à excreção de protease.

Símbolos: (a) = Linhagens referidas na Tabela 1. As linhagens L-68m e N-17Gm são instáveis em relação à excreção de protease

Linha- gens (a)	Exp. nº	Temperatura de cultivo (°C)											
		37				40				42			
		Col. test.	Col. P^+	%	Col. test.	Col. P^-	%	Col. test.	Col. P^+	%	Col. test.	Col. P^-	%
L-68m	1	4580	1370	29,9	12000	1920	16,0	3251	590	18,1	8200	1950	23,8
	2	6000	1880	31,3	4120	910	22,1	1311	300	22,9	4700	960	20,4
	3	4370	1248	28,5	1752	370	21,1	6020	1640	27,2	1110	380	34,2
N-17Gm	1	5800	1471	25,4	3121	400	12,8	7100	1500	21,1	2100	490	23,3
	2	4400	890	20,2	1113	290	26,1	4920	860	17,5	1880	450	23,9
	3	11180	2600	23,3	6800	1700	25,0	7100	1780	25,1	6000	1040	17,3

A rifampicina, em concentração menor (0,3 a 3,0 µg/ml) do que a usada para a *E. coli* (5,0 a 7,5 µg/ml) (2), converteu, eficientemente, células P^+ em P^- de linhagens de *P. mirabilis*.

As células P^+ estáveis mostraram-se muito sensíveis a essa concentração da droga e não se converteram em P^- .

A mitomicina C é conhecida inibidora da síntese de DNA (5, 16). Em doses menores (1,0 a 2,0 µg/ml) do que as utilizadas para eliminação dos plasmídios, salicilato, cânfora e naftaleno em *Pseudomonas* (6, 7, 11, 25), transformou eficientemente células P^+ em P^- de linhagens instáveis de *P. mirabilis*. As linhagens estáveis P^+ não foram mais sensíveis do que as instáveis, e não foram convertidas em P^- .

O crescimento sob temperaturas mais elevadas do que a fisiológica, revela-se algumas vezes como eficiente método de cura (3, 12). Resistências à tetraciclina e penicilina foram curados sob ação da temperatura (44°C) em estafilococos, e estudos cinéticos demonstraram que o crescimento bacteriano, nessa temperatura, seleciona segregantes livres de plasmídio (22).

A frequência espontânea de células P^- em *P. mirabilis* não foi aumentada pela ação da temperatura elevada. Esse método de cura, no entanto, não tem valor absoluto. Alguns plasmídios não se mostram sensíveis à elevação da temperatura de crescimento, como acontece com *Streptococcus faecium*, onde a propriedade ureiolítica, que mostra evidências da ser codificada por plasmídio, não apresenta efeito significativo (8).

Agradecimentos

Os autores são gratos a Maria Célia Frattini pelo trabalho de datilografia dos manuscritos. Este trabalho recebeu o auxílio 40.2510/82 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Referências Bibliográficas

1. Affonso, M.H.T. - Natureza genética da fermentação de lactose em amostras de *Salmonella typhimurium*. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 38p., 1976. (Tese de Mestrado).
2. Bazzicalupo, P. & Tocchini-Valentini, P.G. - Curing of an *Escherichia coli* episome by rifampicin. Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.), 69:298-300, 1972.
3. Bondi, A.; Kornblum, J. & Saint-Phalle, M. - Isolation of penicillin-susceptible mutants from penicillinase-producing strains of *Micrococcus pyogenes*. Proc. Soc. Exp. Biol., 83:527-541, 1953.
4. Bouanchaud, D.H.; Scavizzi, M.R. & Chabbert, Y.A. - Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteriaceae and Staphylococci. J. Gen. Microbiol., 54:417-425, 1969.
5. Boyce, R.P. & Howard-Flanders, P. - Genetic control of DNA breakdown and repair in *Escherichia coli* K12 treated with mitomycin C or ultraviolet light. Z. Vererbungslehre, 95:345-349, 1964.
6. Chakrabarty, A.M. - Plasmid in *Pseudomonas*. Ann. Rev. Genet., 10:7-30, 1976.

7. Chakrabarty, A.M.; Chou, G. & Gunsalus, I.C. - Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in *Pseudomonas* incompatibility. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 70:1137-1140, 1973.
8. Cook, A.R. - The elimination of urease activity in *Streptococcus faecium* as evidence for plasmid-coded urease. J. Gen. Microbiol., 82:49-58, 1976.
9. Costa, S.O.P.; Bianco, M. & Bonato, M.C.M. - Genetic instability in *Proteus mirabilis* as evidence for plasmid-coded protease. Microbiol. Genet. Bull., 51:2-7, 1981.
10. Costa, S.O.P.; Bonato, M.C.M. & Bianco, M. - Instability of protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. I - A study of newly isolated strains. Rev. Microbiol. (São Paulo), 13:35-45, 1982.
11. Dunn, N.W. & Gunsalus, I.C. - Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in *Pseudomonas putida*. J. Bact., 114:974-979, 1973.
12. Fairbrother, R.W.; Parker, L. & Eaton, B.R. - The stability of penicillinase-producing strains of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 10:309-316, 1974.
13. Frazier, W.C. - A method for detection of changes in gelatin due to bacteria. J. Infect. Dis., 39:302-309, 1926.
14. Hirota, Y. - The effect of acridine dyes on mating type factors in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 46:57-64, 1960.
15. Hohn, B. & Korn, D. - Co-segregation of a sex factor with the *Escherichia coli* chromosome during curing by acridine orange. J. Molec. Biol., 45:385-395, 1969.
16. Iyer, V.N. & Szybalski, W. - Mitomycin C and porfiramycin: chemical mechanisms of activation and cross-linking of DNA. Science, 145:55-57, 1964.
17. Johnston, J.H. & Richmond, M.H. - The increased rate of loss of penicillinase of rifampicin. J. Gen. Microbiol., 60:137-139, 1970.
18. Kraméry, V. & Janouskova, J. - Effect of rifampicin on stability and transfer of R-factors. Z. Allg. Mikrobiol., 11:97-101, 1971.
19. Lederberg, J. & Lederberg, E.M. - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact., 63:390-406, 1952.
20. Lepecq, J.B. & Paoletti, J.A. - A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. J. Molec. Biol., 27:87-106, 1967.
21. Maggi, N.; Pasqualucci, R.; Ballotta, R. & Sensi, P. - Rifampicin: a new orally active rifamycin. Chemotherapia, 11:285, 1966.
22. May, J.W.; Houghton, R.H. & Perret, C.J. - The effect of growth at elevated temperature on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 37:157-169, 1964.
23. Mills, G.L. & Wilkins, J.M. - The isolation and properties of a protease from *Proteus vulgaris*. Biochem. Biophys. Acta, 30:63-70, 1958.
24. Mitsuhashi, S.; Harada, K. & Kameda, M. - Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavin. Nature (Lond.), 193:947, 1961.
25. Rheinwald, J.G.; Chakrabarty, A.M. & Gunsalus, I.C. - A transmissible plasmid controlling camphor degradation in *Pseudomonas putida*. Proc. Natl. Acad. Sci. (Wash.), 70:885-889, 1973.
26. Riva, S.F.; Fietta, A.; Bertio, M.; Silvestri, L.G. & Romero, O.E. - Relationships between curing of F episome by rifampicin and by acridine orange in *Escherichia coli*. Antimicrob. Ag. Chemoter., 5:456-462, 1973.
27. Salisbury, V.; Hedges, R.W. & Datta, N. - Two modes of "curing" transmissible bacterial plasmids. J. Gen. Microbiol., 70:443-452, 1972.
28. Tomchick, R. & Mandel, H.G. - Biochemical effects of ethidium bromide in microorganisms. J. Gen. Microbiol., 36:225-236, 1964.
29. Tomoeda, M.; Inuzuka, M.; Kubo, N. & Nakamura, S. - Effective elimination of drug resistance and sex-factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. J. Bact., 95:1078-1089, 1968.
30. Waring, M.J. - Cross-linked and intercalation of nucleic acids. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 16:235-265, 1966.
31. Watanabe, T. & Ogata, C. - Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. IX - Recombination of an R factor with F. J. Bact., 91:43-50, 1966.
32. Yamagata, H. & Uchida, H. - Effect of acridine orange on sex factor multiplication in *Escherichia coli*. J. Molec. Biol., 46:73-84, 1969.

DECRÉSCIMO DA POPULAÇÃO BACTERIANA ELIMINADA POR PACIENTES COM TUBERCULOSE PULMONAR TRATADOS COM ESQUEMA DE CURTA DURAÇÃO

Laerte Manhães de Andrade
Ana de Miranda Batista
Carina Camurati
& Anna Grazia Marsico

Instituto de Fisiologia e Pneumologia UFRJ
Rua Carlos Seidl, 813
20931 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Foram estudados 10 pacientes tuberculosos, com baciloskopía e cultura positivas, tratados com esquema de curta duração constituído de rifampicina, hidrazida e etambutol ou pirazinamida. A avaliação da população bacteriana, antes e depois da quimioterapia, foi feita por dois métodos quantitativos: baciloskopía direta do escarro, após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen e cultura, após descontaminação melo método de Petroff. A população bacteriana inicial variou entre 600.000 e 51.200.000 bacilos por ml e 45.450 e 1.511.250 colônias por ml de escarro. O decréscimo desta população nos dias subsequentes ao início do tratamento não está relacionada com a população inicial, seja ela alta ou baixa. Entretanto, pela baciloskopía, observa-se que o primeiro exame negativo e o último positivo ocorreram mais precocemente no grupo de população baixa do que na alta. Nos primeiros 10 dias de tratamento verificou-se, em média, uma redução na população bacteriana eliminada igual a 33% da inicial, atingindo 2,2% nos primeiros 30 dias; a contagem de colônias, nos mesmos períodos, reduziu-se a 31,4% e 1% respectivamente. O percentual de colônias sobre o número total de bacilos, expressão da viabilidade bacilar, era de 3,6% antes da medicação, caindo para 0,3% após 30 dias de tratamento.

Summary

Decrease of bacterial population of pulmonary tuberculous patients treated by short course chemotherapy

Ten tuberculous patients positive by microscopy and culture treated by short course chemotherapy were studied. The determination of bacterial population, before and after the chemotherapy was made by two quantitative methods: sputum direct microscopy by Ziehl-Neelsen method and culture by Petroff method. The whole population before treatment was between 600,000 and 51,200,000 bacteria by ml of sputum. The viable population was between 45,450 and 1,511,250 colonies by ml. The decrease of the population after beginning of the treatment is not related to the initial population, other low or high. However, by microscopy, the first negative result and the last positive were sooner in the low

population than in the high. In the first ten days of treatment the decrease level was 33% and 2,2% after 30 days. The percentage of colonies was reduced to 31,4% and 1% respectively. The bacillary viability was 3,6% before the treatment and 0,3% after 30 days.

Introdução

Os métodos bacteriológicos são largamente usados no diagnóstico, no controle do tratamento da tuberculose e na avaliação da eficácia dos esquemas terapêuticos empregados. Essa eficácia é avaliada pela queda da população bacteriana, eliminada pelos pacientes tuberculosos em tratamento, revelada pela baciloscoopia direta no escarro ou pela cultura.

A baciloscoopia é mais usada por ser um método simples e rápido, portanto acessível para determinar o número total de bacilos eliminados pelo paciente, sem considerar se eles estão vivos, se são viáveis ou se estão mortos. A cultura, embora seja mais demorada e mais trabalhosa, além de apresentar um índice de positividade maior do que a baciloscoopia, tem a vantagem de revelar apenas os bacilos viáveis, permitir que se lhe identifique a espécie e testar a sensibilidade do bacilo às drogas utilizadas no tratamento da tuberculose.

O presente trabalho, visa determinar a velocidade de queda da população bacteriana total (baciloscoopia) e a viabilidade (cultura) dos bacilos isolados de pacientes tratados com esquema de curta duração. Para isto, foram usados métodos quantitativos de baciloscoopia e cultura no material colhido em dias alternados.

O número de bacilos eliminados no escarro, tem papel relevante na transmissão da infecção. Saber como reage a população inicial e em que proporção ela é reduzida nos primeiros dias de tratamento, tem importância clínica e epidemiológica.

Material e Métodos

Dez pacientes virgens de tratamento, portadores de bacilos sensíveis às drogas tuberculostáticas, foram internados nas enfermarias do Instituto de Fisiologia e Pneumologia da UFRJ, durante cerca de um mês, e submetidos a um protocolo de tratamento com a duração prevista de 6 meses, na modalidade assistida. Os medicamentos foram fornecidos pela Central de Medicamentos (isoniazida 100mg - Laboratório Farmacêutico da Marinha; rifampicina + isoniazida: 300 + 200mg - Laboratório Químico Farmacêutico do Exército; etambutol (Myambutol) 400mg - Lederle; pirazinamida 500mg - Lafers, Porto Alegre, RS).

A evolução bacteriológica desses 10 pacientes foi acompanhada pela baciloscoopia (bacilos/ml) e pela cultura (colônias/ml), quantitativas, realizadas em dias alternados, a partir do início do tratamento. Foram examinados 283 amostras de escarro (Tabela 1).

Colheita do material - O escarro foi colhido em dias alternados, sendo a primeira colheita antes do início do tratamento; as demais feitas ao acordar, antes de tomar a medicação.

Baciloscoopia quantitativa - Esta técnica foi executada em esfregaços corados pelo método de Ziehl-Neelsen. Para o cálculo do número de bacilos por ml de escarro, utilizou-se o método recomendado por Toman (10), a seguir descrito:

a) 0,01ml de escarro é espalhado na lâmina, com alça de níquel-cromo de 3mm de

Tabela 1 - Pacientes e esquemas terapêuticos.

Símbolos: R = Rifampicina; I = Isoniazida; E = Etambutol; Z = Pirazinamida

Nº	Pacientes	Esquemas	Início do tratamento
01	M.A.G.R.	2 RIZ - 2 RI - 2 I	03.09.82
02	R.C.	2 REI - 2 RI - 2 I	10.09.82
03	G.A.S.	2 REI - 4 RI	11.09.82
04	J.L.C.	2 REI - 2 RI - 2 I	21.09.82
05	J.D.F.	2 REI - 4 RI	03.10.82
06	E.F.C.	2 RIZ - 4 RI	09.10.82
07	P.C.A.	2 RIZ - 2 RI - 2 I	28.10.82
08	Z.S.	2 REI - 2 RI - 2 I	10.12.82
09	J.M.O.	2 RIZ - 4 RI	30.12.82
10	J.C.A.S.	2 RIZ - 2 RI - 2 I	20.01.83

diâmetro interno;

b) área do esfregaço na lâmina ($1 \times 4\text{cm}$): 400mm^2 ;

c) área do campo microscópico com objetiva de imersão (10×100): $0,02\text{mm}^2$. O esfregaço todo tem 20.000 campos microscópicos;

d) número de bacilos na lâmina: contar o número de bacilos em 100 campos, o que corresponde a 0,5% do esfregaço. Para ter 100% da lâmina, multiplicar por 200;

e) bacilos por ml de escarro - multiplicar o número de bacilos na lâmina por 100, por causa do volume de escarro ($0,01\text{ml}$) espalhado na lâmina. Exemplo: 340 bacilos em 100 campos $340 \times 200 = 68.000$ bacilos na lâmina, $68.000 \times 100 = 6.800.000$ bacilos por ml;

f) os pacientes da série foram distribuídos em ordem crescente da população bacteriana inicial e divididos, aleatoriamente, em 2 grupos de 5 pacientes: um com população bacteriana entre 600.000 e 6.400.000 bacilos/ml, identificado como de "população baixa"; outro, com população bacteriana entre 13.000.000 e 57.200.000 bacilos/ml, identificado como de "população alta".

Tabela 2 – Baciloscopy: decréscimo da média dos bacilos eliminados (bacilos/ml) em períodos de 10 dias, por 10 pacientes tuberculosos tratados.

Símbolos: * = Última baciloscopy positiva: paciente 01 aos 82 dias e paciente 07 aos 90 dias

Grupo	Pacientes	População média inicial	Dias de tratamento					
			1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
(bacilos/ml)	05	660.000	0	80.000	0	0	0	0
	03	1.200.000	92.000	15.000	0	0	0	0
	01*	4.000.000	480.000	2.440.000	304.000	180.000	160.000	400.000
	06	6.000.000	3.612.000	260.000	88.000	532.000	220.000	110.000
Sub-total	02	6.400.000	1.800.000	16.000	5.000	10.000	0	0
		18.260.000	5.984.000	2.811.000	397.000	722.000	380.000	510.000
(bacilos/ml)	04	13.000.000	1.720.000	708.000	60.000	140.000	0	0
	09	19.280.000	696.000	125.000	216.000	116.000	48.000	0
	10	28.600.000	11.286.000	2.800.000	1.713.000	128.000	0	0
	08	29.280.000	23.464.000	360.000	330.000	32.000	0	0
Sub-total	07*	57.200.000	11.972.000	4.772.000	904.000	693.000	316.000	220.000
		147.360.000	49.138.000	8.765.000	3.233.000	1.109.000	364.000	220.000
Total		165.620.000	55.122.000	11.576.000	3.620.000	1.831.000	744.000	730.000

Cultura quantitativa - Para a descontaminação do escarro, utilizou-se o método de Petroff, recomendado pela OMS (8). A cultura do escarro obedeceu à sequência abaixo descrita:

a) colocar igual volume de escarro e de hidróxido de sódio a 4% com vermelho fenol em tubo de centrifugo com rolha de borracha. Se o escarro é muito espesso, pode-se colocar o dobro do volume de hidróxido de sódio;

b) colocar no agitador de Kahn por 20 minutos, com o tubo deitado e bem arrolhado. Esperar 5 minutos antes de abrir o tubo;

c) neutralizar com ácido sulfúrico a 10%, gota a gota, lentamente, para não ultrapassar o ponto de viragem do indicador;

d) centrifugar por 15 minutos a 3.000rpm;

e) desprezar o sobrenadante e diluir o sedimento, de acordo com a riqueza bacilar verificada ao microscópio: menos de 100 bacilos em 100 campos: diluir 1:5 e 1:50; entre 101 e 1.000: diluir a 1:50 e 1:500; mais de 1.000: diluir a 1:500 e 1:5.000. Semear 0,2ml de cada diluição no meio de Lowenstein-Jensen, retirando antes a água de condensação;

f) molhar a superfície do meio com o indicador e colocar na estufa a 37°C com os tubos deitados e a rolha frouxa até a secagem (24 a 48 horas). Apertar a rolha e colocar os tubos em posição vertical. Fazer a contagem das colônias após 28 a 42 dias, com auxílio de lente. Caso haja diferença nestas contagens, considerar como válida a que der maior número de colônias;

g) cálculo do número de Unidades Formadoras de Colônias por ml de escarro: multi-

PLICAR o número de colônias pela diluição e dividir pelo volume de escarro, para ter o número de UFC corrigido; multiplicar por 5, porque foram semeados 0,2ml do sedimento diluído em cada tubo, para ter o resultado final em UFC por ml de escarro. Exemplo: volume de escarro descontaminado: 2ml. Número de colônias: 50 na diluição 1:5.000. Cálculo: $50 \times 5.000 = 250.000$; $250.000 : 2 = 125.000$; $125.000 \times 5 = 625.000$ UFC/ml.

Tabela 3 - Bacilosscopia:
percentual de queda dos bacilos eliminados em períodos de 10 dias, por 10 pacientes tuberculosos tratados

Grupo	Pacientes	População inicial (%)	Dias de tratamento					
			1-10 (%)	11-20 (%)	21-30 (%)	31-40 (%)	41-50 (%)	51-60 (%)
População baixa	05	100,0	0,0	12,1	0,0	0,0	0,0	0,0
	03	100,0	7,7	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	01	100,0	12,0	61,0	7,6	4,5	4,0	10,0
	06	100,0	50,2	4,3	1,5	8,9	3,7	1,8
	02	100,0	28,1	0,25	0,08	0,15	0,0	0,0
	Sub-total	100,0	32,8	15,4	2,2	4,0	2,0	2,8
População alta	04	100,0	13,2	5,5	0,5	1,0	0,0	0,0
	09	100,0	3,6	0,6	1,1	0,6	0,25	0,0
	10	100,0	39,5	9,8	6,0	0,4	0,0	0,0
	08	100,0	80,1	1,2	1,1	0,1	0,0	0,0
	07	100,0	21,0	8,3	1,6	1,2	0,5	0,38
	Sub-total	100,0	33,3	5,9	2,2	0,8	0,2	0,1
Total	100,0	33,3	7,0	2,2	1,1	0,4	0,4	0,4

Resultados

A população bacteriana inicial, total ou viável, varia em função da forma clínica de cada paciente. É importante avaliar o comportamento dessa população na primeira fase do tratamento, chamada "fase de ataque", pelo exame de escarro dos pacientes em dias alternados. Para verificar se essa população inicial, total ou viável, tem influência nos resultados, os 10 pacientes foram separados em dois grupos de 5, chamados de população "baixa" ou "alta" e os resultados apresentados pela média do número de bacilos eliminados ou de colônias obtidas após períodos de 10 dias (média de 5 determinações) de tratamento, até a negativação.

Pelos dados da bacilosscopia (Tabela 2), verifica-se que há grande irregularidade na queda da população bacteriana inicial dos 10 pacientes observados. Esta queda, em média, foi bastante acentuada desde os primeiros dias de tratamento. Após 60 dias, decresceu de 18.260.000 iniciais para 510.000 bacilos/ml no grupo de população alta e de 147.360.000 para 220.000 bacilos/ml no grupo de população baixa. Quanto a negativação, aos 30 dias de tratamento, 2 dos 5 pacientes do grupo de população baixa estavam negativos, ao passo que no grupo de população alta, não houve negativos. Apenas 2 pacientes tiveram bacilosscopia positiva após 60 dias de tratamento, sendo um do grupo de população baixa com 82 dias e outro do grupo de população alta, com 90 dias, embora em níveis baixos.

Tabela 4 - Cultura: decréscimo da média de colônias obtidas de bacilos eliminados (colônias/ml), em períodos de 10 dias, por pacientes tuberculosos tratados.

Símbolos: * = Este paciente teve a última cultura positiva após 78 dias de tratamento \

	Pacientes	População inicial	Dias de tratamento					
			1-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60
População baixa (colônias/ml)	02	45.450	33.606	533	52	308	0	36
	03	75.000	8.740	275	17	0	-	0
	01	105.000	12.126	4.483	70	279	-	65
	06	125.000	7.938	1.347	1.214	1.291	495	59
	05	375.000	141	2.025	32	1.250	183	-
	Sub-total	725.450	62.551	8.763	1.385	3.128	678	170
População alta (colônias/ml)	10	500.000	138.541	144.919	16.206	380	169	0
	04	590.000	27.190	5.445	1.565	163	13	0
	09	833.333	253.508	3.266	426	959	99	1
	07*	937.000	456.320	269.299	19.346	2.066	921	259
	08	1.551.250	675.333	72.208	11.615	107	0	-
	Sub-total	4.411.583	1.550.892	495.137	49.158	3.675	1.202	260
Total	5.137.000	1.613.443	503.900	50.543	6.803	1.880	430	

Tabela 5 - Cultura: percentual de queda da média de colônias obtidas dos bacilos eliminados (colônias/ml) em períodos de 10 dias, por 10 pacientes tuberculosos tratados

	Pacientes	População inicial (%)	Dias de tratamento					
			1-10 (%)	11-20 (%)	21-30 (%)	31-40 (%)	41-50 (%)	51-60 (%)
População baixa	02	100,0	74,0	1,4	0,1	1,3	0,0	0,08
	03	100,0	12,0	0,4	0,02	0,0	-	0,0
	01	100,0	11,5	4,3	0,07	0,3	-	0,06
	06	100,0	6,4	1,1	1,0	1,0	0,4	0,05
	05	100,0	0,03	0,5	0,008	0,3	0,05	0,02
	Sub-total	100,0	8,6	1,2	0,2	0,4	0,09	0,02
População alta	10	100,0	28,0	29,0	3,2	0,07	0,03	0,0
	04	100,0	4,6	0,9	0,3	0,02	0,003	0,0
	09	100,0	30,4	0,4	0,05	0,1	0,01	0,0001
	07	100,0	49,0	28,7	2,0	0,2	0,1	0,03
	08	100,0	43,5	4,6	0,7	0,007	0,0	-
	Sub-total	100,0	35,1	11,2	1,1	0,06	0,003	0,005
Total		100,0	31,4	9,8	1,0	0,1	0,4	0,008

Pelos percentuais das médias de bacilos por mililitro de escarro (Tabela 3), observa-se que o decréscimo se processa de maneira bastante nítida, embora sem regularidade, entre os 5 pacientes de cada grupo. Nos primeiros 10 dias, os percentuais caíram a níveis praticamente iguais (32,8% e 33,3%), atingindo 2,2% no 30º dia de tratamento e aos 60 dias, 2,8% e 0,1% respectivamente.

Na Tabela 4 são apresentados os resultados das culturas, tendo sido obedecidos os mesmos critérios de análise usados na baciloscopya. Observa-se que a população de bacilos viáveis apresenta queda sistemática e mais uniforme do que a baciloscopya, a partir dos primeiros dias de tratamento. No grupo de população baixa, o número de colônias caiu de 725.450 para 170 e no grupo de população alta, de 4.411.583 para 260 colônias/ml aos 60 dias de tratamento. Após 30 dias de tratamento, não houve negativação em qualquer dos 10 pacientes. Aos 60 dias, houve 3 pacientes positivos no grupo de população baixa e 3 no de população alta. Após este período, apenas um paciente teve cultura positiva aos 78 dias de tratamento.

Pelos percentuais das médias de colônias/ml de escarro (Tabela 5), observa-se que a população viável cai mais rapidamente no grupo de população baixa (8,6%) do que no grupo de população alta (31,4%) nos primeiros 10 dias de tratamento; depois dos 30 dias, a queda é maior no grupo de população alta. Aos 60 dias, estes percentuais caíram a 0,02% e 0,005% respectivamente.

Verifica-se que no grupo de população baixa (Tabela 6), a primeira baciloscopya negativa ocorreu 17,6 dias antes do que no grupo de população alta, enquanto que a primeira cultura negativa no grupo de população baixa ocorreu 5,6 dias depois da alta, o inverso portanto. A última baciloscopya positiva no grupo de população baixa ocorreu 12,8 dias antes do grupo de população alta, enquanto que a última cultura positiva ocorreu 5,2 dias antes do que no grupo de população alta.

Tabela 6 - Evolução bacteriológica dos grupos com população baixa e alta. Dias nos quais ocorreram o primeiro exame negativo e o último positivo, em relação ao início do tratamento.

Símbolos: * = A primeira cultura negativa ocorreu 5,6 dias antes, no grupo de população alta; a = Diferença entre médias estatisticamente significativa ($t = -2,99$, $p < 0,02$); b, c, d = Diferença entre médias estatisticamente insignificantes ($t = -0,61$ e $p > 0,50$; $t = 0,40$ e $p > 0,60$; $t = -0,53$ e $p > 0,60$, respectivamente)

População bacteriana	Pacientes	Baciloscopya		Cultura	
		Primeiro negativo a	Último positivo b	Primeiro negativo c	Último positivo d
Baixa	05	2	20	88	50
	03	10	16	16	22
	01	8	82	66	52
	06	18	60	48	60
	02	8	38	26	54
Alta	Total	46	216	244	238
	Média	9,2	43,2	48,8	47,6
	04	10	36	36	50
	09	36	50	52	54
	10	36	38	36	42
	08	36	34	36	38
	07	66	122	56	80
	Total	184	280	216	264
	Média	26,8	56,0	43,2	52,8
	Diferença	17,6	12,8	5,6*	5,2

Os resultados da Tabela 7, permitem comparar a queda da população bacteriana inicial, pela média dos 10 pacientes, pela baciloscopia e pela cultura, em dias alternados. Já nos primeiros dias de tratamento, a população bacteriana começa a cair de maneira significativa até atingir, pela baciloscopia, 0,5% e pela cultura 0,03% nos 32 dias de tratamento.

A viabilidade da população bacteriana antes e durante o tratamento é expressa pela proporção entre o número de colônias sobre o número total de bacilos eliminados, por mililitro de escarro. A viabilidade inicial era de 3,6%, caindo, embora de maneira irregular, para 0,3% ao final de 32 dias. De 16 determinações, 11 estiveram abaixo e 5 acima do nível inicial.

A Tabela 8 registra o decréscimo global da população bacteriana eliminada, avaliada pela baciloscopia e pela cultura, permitindo concluir que a população viável se reduz mais rapidamente, embora guardando proporção com o decréscimo baciloscópico. Pela média de todos os pacientes, o número de bacilos caiu para 33,3% aos 10 dias, chegando a 2,2% da população inicial ao fim de 30 dias de tratamento. Pela cultura, esses percentuais foram 31,4% e 1% respectivamente.

Discussão

O exame de escarro, segundo Farer (3) é o melhor método para avaliação do momento em que os pacientes sob tratamento, deixam de ser infectantes. A queda da população bacteriana eliminada se processa a partir dos primeiros dias de medicação, sabendo-se que os bacilos podem desaparecer do escarro antes de um mês, ou manter-se em níveis baixos de eliminação por vários dias.

Para melhorar avaliação e comparação dos resultados, os métodos bacteriológicos foram adaptados. No caso da baciloscopia, em lugar de exprimir seus resultados em função do número de bacilos por campo microscópico, a referência passou a ser pelo número de bacilos eliminados por mililitro de escarro, segundo o método preconizado por Tomam (10). Idêntico procedimento houve com a cultura - foi calculado o número de Unidades Formadoras de Colônias, também por mililitro de escarro, conforme adaptação introduzida pelos autores no método usado por Yeager & col. (11). Estes autores em 1967, haviam constatado a diminuição logarítmica do número de bacilos encontrados no exame direto de escarro de doentes tratados, verificando que o declínio começava após 2 semanas do início da medicação, continuando de maneira variável nos períodos subsequentes.

A população bacteriana inicial decresce de maneira rápida e sistemática no inicio do tratamento. Entretanto, foram verificados alguns resultados irregulares, interpretados como decorrentes da colheita inadequada da amostra, da irregularidade na distribuição dos bacilos no escarro, da técnica de seleção da partícula a ser utilizada no preparo do esfregaço ou da possível variação na eliminação bacilar, por parte dos pacientes. Khomenko & Tchukanov (6) observaram relação entre a velocidade de negativação e a população bacteriana inicial, o que não ficou claro no presente estudo, quando se trata da população viável. Observa-se que o número total de bacilos revelados pela baciloscopia cai mais lentamente do que o número de colônias, observado pela cultura em ambos os grupos, de população bacteriana baixa ou alta (1). Apenas um paciente do grupo de população alta teve a última cultura positiva

Tabela 7 - Viabilidade média dos bacilos eliminados por 10 pacientes tuberculosos nos 32 dias de tratamento.

Símbolos: bac = Bacilos; col = Colônias

Dias de tratamento	Baciloscopia (bac/ml)	%	Cultura (col/ml)	%	Viabilidade (col/bac)
0	33.124.000	100,0	1.194.409	100,0	3,6
2	13.349.400	40,3	402.929	33,7	3,0
4	17.698.000	53,4	424.003	35,5	2,4
6	9.740.000	29,4	385.830	32,2	4,0
8	4.848.000	14,6	143.176	12,0	2,9
10	2.720.000	8,2	56.501	4,7	2,1
12	4.068.000	12,3	130.184	10,9	3,2
14	2.093.000	6,3	41.962	3,4	2,0
16	2.429.330	7,3	220.628	18,4	9,1
18	1.240.000	3,7	60.565	5,0	4,9
20	2.015.000	6,0	13.600	1,1	0,7
22	488.000	1,5	23.173	1,9	4,7
24	505.000	1,5	9.692	0,8	1,9
26	493.330	1,5	3.280	0,3	0,7
28	1.280.000	3,9	8.124	0,7	0,6
30	384.000	1,2	24.508	2,0	6,4
32	156.660	0,5	410	0,03	0,3

após 78 dias de tratamento.

A significância da diferença entre as médias foi avaliada pelo teste t de Student para amostras não pareadas (Tabela 6). O tempo médio de tratamento com o qual se verificou a primeira bacilosscopia de escarro negativa, foi significativamente menor no grupo de pacientes com população bacteriana baixa. Entretanto, os dois grupos não diferiram significativamente quanto ao tempo médio de tratamento com o qual se verificou a última bacilosscopia positiva. Esta afirmativa também é verdadeira para os tempos médios de tratamento com os quais ocorreram a primeira cultura de escarro negativa e a última positiva.

Visto que é usado um volume de escarro e o sedimento do material descontaminado é usado para a semeadura, alguns fatores de variação acima apontados deixam de ter influência nos resultados. Assim, a cultura oferece resultados mais uniformes durante os sucessivos períodos de acompanhamento. Sabe-se que na população bacteriana eliminada encontram-se bacilos vivos, inviáveis ou mortos e que as colônias podem ser originadas de bacilos isolados ou de grupos de 2 ou mais bacilos. Estes fatores não permitem que haja proporcionalmente entre o número de bacilos e as diluições do sedimento semeadas, conforme foi assinalado por Bercea & col. (2), Le Lirzin & Cannetti (7) e Jindani & col. (5), sem prejuízo para a interpretação dos resultados.

A viabilidade do bacilos é também influenciada pelo tratamento (Tabela 7). Das 16 determinações, em dias alternados, 11 ficaram abaixo da inicial de 3,6% e 5 acima, refletindo a queda da viabilidade sob a ação da medicação. Esta viabilidade inicial, segundo Hobby & col. (4), pode ser influenciada pelo processo de descontaminação. O método de Petroff, com neutralização logo após a agitação de 20 minutos, reduz o efeito do hidróxido de sódio sobre os bacilos, permitindo o crescimento até na diluição de 1:5.000. Considerando que a infectividade é proporcional ao número de bacilos eliminados e a sua viabilidade, pode-se inferir que ela, nos pacientes observados, seja bastante reduzida em relação ao período anterior ao tratamento (9).

Conclusões

1. A bacteriologia é importante na avaliação da eficácia dos esquemas terapêuticos para tratamento da tuberculose. A modalidade de curta duração é uma valiosa arma para o controle da doença.

2. As técnicas de bacilosscopia e cultura quantitativas são de fácil execução e quando realizadas na fase inicial de ataque, fornecem valiosa informação sobre a eficácia terapêutica. Elas permitem avaliar o comportamento da população bacteriana sob o efeito da medicação.

3. A população inicial eliminada pelos pacientes é muito variável, não só pela bacilosscopia como pela cultura, dependendo da forma clínica do paciente.

4. A redução da quantidade de bacilos eliminados pelos pacientes é precoce e significativa no sentido de reduzir a infeciosidade dos pacientes a partir dos primeiros dias de tratamento.

5. A queda percentual do número de bacilos e de colônias não está relacionada com a população bacteriana inicial, seja ela baixa ou alta.

6. O tempo médio de tratamento com o qual se verifica a primeira bacilosscopia de escarro negativa foi significativamente menor no grupo de população bacteriana baixa, o mesmo não ocorrendo com a última bacilosscopia positiva e a primeira cultura negativa e a última positiva.

Tabela 8 - Bacilosscopia e cultura: decréscimo da população bacteriana eliminada por 10 pacientes tuberculosos tratados.

Símbolos: bac = Bacilos; col = Colônias

Dias de tratamento	Bacilosscopia (bac/ml)	%	Culturas (col/ml)	%
0	165.620.000	100,0	5.137.000	100,0
1-10	55.122.000	33,3	1.613.443	31,4
11-20	11.576.000	7,0	503.900	9,8
21-30	3.620.000	2,2	50.543	1,0
31-40	1.831.000	1,1	6.803	0,1
41-50	744.000	0,4	1.880	0,04
51-60	730.000	0,4	430	0,08

Agradecimentos

Pelas facilidades proporcionadas à execução deste trabalho, agradecemos: ao Prof. Geraldo de Noronha Andrade, Diretor do Instituto; ao pessoal do Serviço de Clínica, Professores Ezezar Marques de Andrade e Aunir José Carneiro, à Dra. H. Patrícia de Mello Santoro e à Enfermeira Maria Fátima da Silva; pela análise estatística ao Prof. Marlos A.G. Viana, do Instituto de Matemática da UFRJ e ao Prof. Roberto Bravo de Souza, do IIP; pela ajuda concedida ao Laboratório de Micobactérias, ao CNPq e ao CEPG.

Referências Bibliográficas

1. Anastasatu, C.A.; Bercea, E.; Corlan, E.; Bogdanescu, V.; Marcian, S.; Algeorge, G.; Tousek, J.; Staplova, S.; Papezova, E. & Trnka, L. - Administracion diaria o intermitente de drogas durante la fase de ataque de la quimioterapia antituberculosa. Bol. UICL, 54:28-29, 1979.
2. Bercea, O.; Bogdanescu, V.; Marcian, S. & Bonciocat, N. - The disproportionality between colony count and dilution of the inoculated suspension in quantitative culture of *Mycobacterium tuberculosis*. Tubercle, 49:310-317, 1968.
3. Farer, L.S. - Infectiousness of tuberculosis patients: correspondence. Am. Rev. Respir. Dis., 108:152, 1973.
4. Hobby, G.L.; Lenert, T.F. & Engallena, J.M. - In vitro activity of rifampin against the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. Am. Rev. Respir. Dis., 99:453, 1969.
5. Jindani, A.; Aber, V.R.; Edwards, E.A. & Mitchison, D.A. - The early bactericidal activity of drugs in patients with pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Respir. Dis., 121:939, 1980.
6. Khomenko, A.G. & Tschukanov, V.I. - Efectividad de la rifampicina y de la isoniazida con etambutol o protionamida en pacientes con tuberculosis pulmonar recientemente diagnosticada. Bol. UICL, 54:49, 1979.
7. Le Lirzin, M. & Canetti, G. - The proportionality between bacillary dilutions and the yield of colonies on solid media. Tubercle, 50:182, 1969.
8. Organización Panamericana de la Salud - Manual de normas y procedimientos para programas integrados de control de tuberculosis en América Latina, 1977.
9. Rouillon, A.; Perdrizet, S. & Parrot, R. - Transmission of tubercle bacilli: the effects of chemotherapy. Tubercle, 57:275-299, 1976.
10. Toman, K. - Tuberculosis case-finding and chemotherapy: questions and answers. World Health Organization, 1979.
11. Yeager Jr., H.; Lacy, J.; Smith, L.R. & Le Maistre, C.A. - Quantitative studies of mycobacterial populations in sputum and saliva. Am. Rev. Resp. Dis., 95:998-1004, 1967.

PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *NEISSERIA GONORRHOEAE* A ANTIMICROBIANOS EM BELO HORIZONTE, MG

Gilberto Silveira Antunes

Faculdade de Farmácia UFRGS

Av. Ipiranga, 2752

90000 Porto Alegre RS, Brasil

Carlos Américo Veiga Damasceno

Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Deptº de Microbiologia

Caixa Postal 2486

30000 Belo Horizonte MG, Brasil

& Eduardo Osório Cisalpino

Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Deptº de Microbiologia

Resumo

Setenta e duas amostras de *N. gonorrhoeae* isoladas a partir de secreções uretrais de pacientes do sexo masculino foram testadas frente a diversos antimicrobianos, determinando-se as Concentrações Inibitórias Mínimas, pelo método de diluição em ágar. Os resultados obtidos são relatados nas Tabelas 1 e 2. Correlações positivas foram encontradas entre todos os antimicrobianos testados. Os dados obtidos são comparados com os de outros autores e discutidos, bem como os métodos utilizados.

Summary

Pattern of susceptibility of Neisseria gonorrhoeae against antimicrobials in Belo Horizonte area

Seventy samples of *N. gonorrhoeae* isolated from urethral secretions of male patients were tested over against several antimicrobials; the Minimus Inhibitory Concentrations were determined by the agar dilution method. The results are related in Tables 1 and 2. Positive correlations were found among every tested antimicrobes. The obtained results are compared with those of other authors and discussed, as well the utilized methods.

Introdução

Por muitos anos, a suscetibilidade de *N. gonorrhoeae* a antimicrobianos vem sendo estudada em muitos países (6) e um gradual acréscimo na resistência tem sido observado (17).

A ocorrência de cepas de gonorreia, resistentes à penicilina e a outras drogas, tem-se tornado um importante problema (28), uma vez que o aumento da resistência tem sérias implicações no tratamento da infecção (2). A importância desta

resistência é reforçada pela observação de que a incidência de infecções por *N. gonorrhoeae* tem aumentado em diversas partes do mundo (2, 4, 13, 17), sendo a situação descrita por alguns autores como epidêmica (32).

Desde que foi verificado o aumento da resistência do gonococo à penicilina, as dosagens utilizadas para o tratamento foram sendo progressivamente aumentadas, e tratamentos alternativos passaram a ser usados (23). Entretanto, os dados recolhidos de trabalhos realizados por diversos pesquisadores na última década, determinaram que a sensibilidade do gonococo não diminuiu apenas em relação à penicilina, mas também em relação a outros antimicrobianos (2, 6, 16, 19, 23, 25, 30, 31). Estas pesquisas levaram também à constatação da existência de diferenças regionais entre os padrões de sensibilidade (7, 9, 16, 27).

Cepas de *N. gonorrhoeae* são sensíveis a vários antibióticos, em diferentes concentrações. Nos estudos reportados as sensibilidades relatadas variam grandemente de país para país, assim como a proporção de cepas mais sensíveis e cepas menos sensíveis (3).

A determinação das Concentrações Inibitórias Mínimas para isolados de *N. gonorrhoeae* torna-se pois, importante, porque o aumento das CIMs leva à necessidade de aumento das doses eficientes para o tratamento da infecção (2, 9). A efetividade da droga, no tratamento da gonorréia, não pode ser determinada apenas pela suscetibilidade do gonococo "in vitro", mas associando o conhecimento desta suscetibilidade a outros fatores como o grau de absorção, concentração sanguínea e via de excreção, se terá base para a seleção do antimicrobiano adequado (12).

Por outro lado, fortes correlações têm sido encontradas entre as sensibilidades do gonococo a antimicrobianos de estruturas diferentes e diferentes modos de ação, tendo sido verificado que quando ocorre resistência a um antibiótico, esta resistência tende a registrar-se também em relação a outros antibióticos testados (6, 11, 14, 18, 20, 23, 28, 31), sendo que estas correlações ocorrem com maior intensidade nos níveis mais altos de resistência (21).

Deve ser registrado que, até a presente data, nenhuma pesquisa havia sido realizada em território brasileiro, visando a determinação dos níveis de sensibilidade do gonococo aos antimicrobianos rotineiramente utilizados no combate à blenorragia no Brasil.

O presente trabalho objetivou determinar experimentalmente a faixa de suscetibilidade da *N. gonorrhoeae*, isolada em nosso meio, aos agentes antimicrobianos testados, suas Concentrações Inibitórias Mínimas, bem como analisar possíveis correlações entre suscetibilidades aos diferentes antimicrobianos e comparar os dados obtidos com os de outros países.

Estes objetivos apoiam-se na afirmação de Finger & Handke (3) de que o conhecimento sobre os níveis de sensibilidade do gonococo e a proporção de cepas mais sensíveis e menos sensíveis é essencial tanto para o ajustamento dos esquemas de tratamento, como para o estudo epidemiológico e os procedimentos de controle.

Tabela 1 - Concentrações Inibitórias Mínimas dos 7 antimicrobianos testados, frente à *Neisseria gonorrhoeae*. Número de amostras: 72.

Símbolos: P = Penicilina; T = Tetraciclina; C = Ce-faloridina; R = Rifampicina; E = Eritromicina; A = Ampicilina; C = Cloranfenicol

Antibióticos	Concentrações em microgramas/ml									
	0,005	0,01	0,05	0,01	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	>4,0
P	8	36	17	4	7					
T			2	10	22	20	14	4		
C					2	12	26	15	12	5
R		4	13	32	19	4				
E		7	29	21	8	5	2			
A		33	14	16	7	2				
C				1	7	42	12	5	3	2

Tabela 2 - Concentrações Inibitórias Mínimas dos 7 antimicrobianos testados frente à *Neisseria gonorrhoeae*.

Número de amostras: 72. Resultados expressos em percentual.

Símbolos: P = Penicilina; T = Tetracilina; C = Cefaloridina; R = Rifampicina; E = Eritromicina; A = Ampicilina; C = Cloranfenicol

Antibióticos	Concentrações em microgramas/ml									
	0,005	0,01	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0	2,0	4,0	>4,0
P	11,1	50,0	23,6	5,6	9,7					
T			2,7	13,9	30,6	27,8	19,4	5,6		
C					2,8	16,7	36,1	20,8	16,7	6,9
R		5,6	18,0	44,4	26,4	5,6				
E		9,7	40,3	29,2	11,1	6,9	2,8			
A		45,8	19,5	22,2	9,7	2,8				
C					1,4	9,7	58,3	16,7	6,9	4,2

Material e Métodos

Foram examinados 98 pacientes portadores de infecção uretral aguda, que recorreram ao Centro de Saúde Carlos Chagas e ao Anexo de Dermatologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, tendo sido obtidas 72 amostras de *N. gonorrhoeae*. Aos pacientes selecionados, foi solicitado o preenchimento de um questionário, que visava complementar, com dados paralelos, os objetivos desta pesquisa (dados ainda não publicados).

A secreção uretral foi coletada com alça de platina e imediatamente semeada em meio de Thayer & Martin (29). As placas semeadas foram incubadas sem demora, em atmosfera parcial de CO₂ a 37°C. As secreções foram semeadas e incubadas no local da coleta pois este procedimento apresenta resultados marcadamente superiores aos obtidos no laboratório após o transporte dos espécimes (8).

Após incubação de 24 horas, as placas foram examinadas para colônias suspeitas. A identificação do gonococo foi baseada no exame da morfologia colonial, no estímulo do crescimento em atmosfera de CO₂ e no exame da morfologia celular em lâminas coradas pelo método de Gram e preparadas a partir da colônia suspeita. Foi igualmente testada a capacidade de formação de oxidase (5) com o reativo di-metil p-aminoanilina mono-hidroxi-clorada (Merck). Foram realizadas provas confirmatórias de identificação, testando-se a capacidade dos isolados em fermentar os açúcares glicose, maltose, sacarose e lactose (1, 15) no meio CTA (BBL) (26).

Após a identificação ter sido levada a efeito, as amostras foram submetidas ao teste de suscetibilidade aos antibióticos pelo método de diluição em ágar (22) para se obter a Concentração Inibitória Mínima. Os antibióticos utilizados foram penicilina, rifampicina, cefaloridina, ampicilina, tetraciclina, eritromicina e cloranfenicol, em concentrações variadas (Tabelas 1, 2 e 3). A Concentração Inibitória Mínima foi considerada como a que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente pelo Coeficiente de Correlação de Spearman (6).

Resultados

Entre todas as amostras isoladas, 72 apresentaram boas condições de isolamento e identificação e foram submetidas ao teste de suscetibilidade que determinou a CIM dos vários antibióticos testados (Tabelas 1 e 2).

A Tabela 3 traz um quadro comparativo entre o presente trabalho e outras pesquisas realizadas, em diversos países, em relação à suscetibilidade do gonococo à penicilina.

As concentrações das drogas são expressas em microgramas/ml.

Discussão

No Brasil, o perfil de sensibilidade do gonococo a drogas antimicrobianas, até a presente data, não havia sido determinado, não existindo pois, um termo de comparação adequado para este trabalho, e a comparação com trabalhos realizados em outros países fica prejudicada devido ao uso, pelos diversos autores, de técnicas diversas e não uniformizadas (24, 27). Entretanto, considerando-se os valores de CIMs relatados por diversos pesquisadores em trabalhos realizados nas décadas de 60 e 70, os dados obtidos nesta pesquisa, levam a supor que também no Brasil tenha havido declínio de sensibilidade da *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos, ainda que em menor nível.

O fato de nossos dados concordarem apenas em parte com aqueles relatados por outros pesquisadores vem, de certa forma, confirmar a afirmação de alguns autores de que existem diferenças geográficas nos padrões de sensibilidade da *N. gonorrhoeae* aos antimicrobianos (10, 16, 27).

Fortes correlações positivas foram encontradas entre todos os pares de antimicrobianos testados.

É sugerido que programas que objetivam detectar mudanças na sensibilidade do gonococo aos antimicrobianos, devam ser efetivados, visando procedimentos racionais na terapia da infecção gonocócica (23) e o presente estudo poderá servir de base para comparações com trabalhos futuros. Para que possamos ter um real perfil da sensibilidade do gonococo aos antibióticos no Brasil, faz-se necessário que pesquisas complementares sejam realizadas, principalmente, em regiões de características sócio-culturais diversas das encontradas na área onde o presente trabalho foi elaborado.

Tabela 3 - Perfil parcial da sensibilidade do gonococo à penicilina, segundo alguns trabalhos publicados na última década

Autores e Referência Bibliográfica	CIM (%)			
	0,05	0,1	0,5	1,0
Phillips 1970 (18)	60,4	34,4	5,2	-
Moses & col. 1971 (16)	32,8	46,3	20,9	-
Robson & Salit 1972 (23)	39,0	47,0	14,0	-
Stoltz & col. 1974 (28)	61,6	27,1	11,3	-
Shahidullah & Greaves 1975	70,0	27,0	3,0	-
Meheus & col. 1976 (14)	58,0	40,0	20,0	-
Finger & col. 1976 (3)	87,7	10,1	2,2	-
Vanhoof & col. 1978 (30)	49,0	41,4	9,6	-
Green 1978 (6)	20,6	56,8	22,6	-
Dillon & col. 1978 (2)	50,3	45,1	4,6	-
Presentes resultados	84,7	15,3	0	-

Referências Bibliográficas

1. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
2. Dillon, J.R.: Eidus, L. & Diena, B.B. - Cross-Canada survey of susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates to six antimicrobial agents. Can. Med. Ass. J., 119:223, 1978.
3. Finger, A. & Handke, G. - Antibiotic sensitivity of gonococci in South Australia, 1974 to 1975. Med. J. Aust. 1:133, 1977.
4. Godden, J.O. - International Symposium on Gonorrhoeae. Can. Med. Ass. J., 109:1043, 1973.
5. Gordon, J. & McLeod, J.W. - The practical application of the direct oxidase reaction in bacteriology. J. Path. Bact., 31:185, 1928.
6. Green, M.J. - In vitro antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in New Zealand. Brit. J. Ven. Dis., 54:316, 1978.
7. Guinan, M.E.; Biddle, J.; Thornsberry, C.; Reynolds, C.; Zaidi, A. & Wiesner, P. - The national gonorrhoeae therapy monitoring study. I - Review of treatment results and of in-vitro antibiotic susceptibility, 1972-1978. Sex. Transm. Dis., 6(2 Suppl.):93-102, 1979.
8. Hosty, T.S.; Freear, M.A.; Baker, C. & Holston, J. - Comparison of transportation media for the culturing of *N. gonorrhoeae*. Am. J. Clin. Path., 62:435, 1974.

9. Jaffe, H.W.; Biddle, J.W.; Thornsberry, C.; Johnson, R.E.; Kaufman, R.E.; Reynolds, G.H. & Wiesner, P.J. - National gonorrhoeae therapy monitoring study: in vitro antibiotic susceptibility and its correlation with treatment results. *N. Engl. J. Med.*, 294:5, 1976.
10. Jaffe, H.W.; Zaidi, A.A.; Thornsberry, C.; Reynolds, G.H. & Wiesner, P.J. - Trends and seasonality of antibiotic resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Inf. Dis.*, 136:684, 1977.
11. Maness, M.J. & Sparling, P.F. - Multiple antibiotic resistance due to a single mutation in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Inf. Dis.*, 128:321, 1973.
12. Martin Jr., J.E.; Lester, A.; Kellogg Jr., D.S. & Thayer, J.D. - In vitro susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to nine antimicrobial agents. *Appl. Microbiol.*, 18:21, 1969.
13. Martin Jr., J.E.; Lester, A.; Price, E.V. & Schmale, J.D. - Comparative study of gonococcal susceptibility to penicillin in United States, 1955-1969. *J. Inf. Dis.*, 122:459, 1970.
14. Meheus, A.; Piot, P.; Pattyn, S.; Van Dyck, E. & Bergue, D.V. - Activity in vitro of ten antimicrobial agents against *N. gonorrhoeae*: a study of the correlation between the sensitivities. *Brit. J. Ven. Dis.*, 52:329, 1976.
15. Morse, S.A.; Stein, S. & Hines, J. - Glucose metabolism in *N. gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.*, 120:702, 1974.
16. Moses, J.M.; Desai, M.S.; Bhosle, C.B. & Trasi, M.S. - Present pattern of antibiotic sensitivity of gonococcal strains isolated in Bombay. *Brit. J. Ven. Dis.*, 47:273, 1971.
17. Osoba, A.O.; Montefiore, D.G.; Sogbetun, A.O.; Alausa, K.O. & Anong, C.N. - Sensitivity pattern of *N. gonorrhoeae* to penicillin and screening for Beta-lactamase production in Ibadan, Nigeria. *Brit. J. Ven. Dis.*, 53:304, 1977.
18. Phillips, I.; Ridley, M.; Rimmer, D.; Lynn, R. & Warren, C. - In vitro activity of twelve antibacterial agents against *N. gonorrhoeae*. *The Lancet*, 1:263, 1970.
19. Platt, D.J. Prevalence of multiple antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Brit. J. Ven. Dis.*, 52:384, 1976.
20. Powell, J.T. & Bond, J.H. - Multiple antibiotic resistance in clinical strains of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in South Carolina. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10:639, 1976.
21. Reyn, A. & Bentzon, M.W. - Relationships between the sensitivities in vitro of *Neisseria gonorrhoeae* to spiramycin, penicillin, streptomycin, tetracycline and erytromycin. *Brit. J. Ven. Dis.*, 45:223, 1969.
22. Reyn, A.; Bentzon, M.W. & Ericsson, H. - Comparative investigations of the sensitivity of *N. gonorrhoeae* to penicillin. *Acta Path. Microbiol. Scad.*, 58:235, 1963.
23. Robson, H.G. & Salit, I.E. - Susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* to seven antibiotics in vitro. *Can. Med. Ass. J.*, 107:959, 1972.
24. Shtibel, R. - A new improved medium for antibiotic susceptibility testing of *N. gonorrhoeae*. *Hlth. Lab. Sci.*, 12:76, 1974.
25. Shtibel, R. - Resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to antibacterial drugs in Ontario. *Hlth. Lab. Sci.*, 13:49, 1976.
26. Shtibel, R. & Toma, S. - *Neisseria gonorrhoeae*: evaluation of some methods used for carbohydrate utilization. *Can. J. Microbiol.*, 24:177, 1978.
27. Sparling, P.F. - Antibiotic resistance in *N. gonorrhoeae*. *Med. Clin. North Am.*, 56:1133, 1972.
28. Stolz, E.; Zwart, H.F.G. & Michel, M.F. - Activity of eight antimicrobial agents in vitro against *N. gonorrhoeae*. *Brit. J. Ven. Dis.*, 51:257, 1975.
29. Thayer, J.D. & Martin Jr., J.E. - Improved medium selective for cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. *Publ. Hlth. Rep.*, 81:599, 1966.
30. Vanhoof, R.; Vanderlinden, M.P.; Hubrechts, J.M.; Butzler, J.P. & Yourassowsky, E. - In vitro activity of antimicrobial agents against *Neisseria gonorrhoeae* in Brussels. *Brit. J. Ven. Dis.*, 54:309, 1978.
31. Watko, L.P. & Brownlow, W.J. - Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolated in the Western Pacific in 1971. *Brit. J. Ven. Dis.*, 51:34, 1975.
32. Willcox, R.R. - A world-wide view of venereal disease. *Brit. J. Ven. Dis.*, 48:163, 1972.

INVASIBILIDADE E ENTEROTOXIGENICIDADE DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* E DAS ESPÉCIES ATÍPICAS DE *YERSINIA* ISOLADAS DO HOMEM E DE CÃES NO BRASIL

Marly P. Nunes

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

Maria Regina F. de Toledo
Luiz R. Trabulsi

Disciplina de Microbiologia
Escola Paulista de Medicina
Rua Botucatu, 862
04023 São Paulo SP, Brasil

& Ilvan D. Ricciardi

Instituto de Microbiologia UFRJ

Resumo

A produção de enterotoxina termoestável (ST) e a invasibilidade foram estudadas em 58 amostras de *Yersinia* (54 *Y. enterocolitica*, 3 *Y. frederiksenii*, e 1 *Y. intermedia*), isoladas do homem e de cães na cidade do Rio de Janeiro. A invasibilidade foi pesquisada em cultura de células HeLa e pelo teste de Serény, enquanto que a enterotoxina ST foi pesquisada pelo método do camundongo recém-nascido. 98,1% das amostras de *Y. enterocolitica* invadiram células HeLa, 88,9% produziram enterotoxina ST e 64,8% provocaram conjuntivite intensa no cobaio, sem causar ceratite; não se observou diferenças entre as amostras isoladas do homem e de cães. As amostras de *Y. frederiksenii* e *Y. intermedia* mostraram-se não invasoras, nos dois testes utilizados, sendo que todas as amostras produziram enterotoxina ST.

Summary

Invasion and enterotoxin production by Yersinia enterocolitica and atypical Yersinia isolated from humans and dogs in Brazil

Fifty eight *Yersinia* strains (54 *Y. enterocolitica*, 3 *Y. frederiksenii*, 1 *Y. intermedia*), isolated from humans and dogs, in Rio de Janeiro, were studied for invasion and heat-stable (ST) enterotoxin production. Invasive ability was searched in the guinea pig eye (Serény test) and in HeLa culture cells, and ST enterotoxin was assayed by the suckling mouse test. 98.1% of the *Y. enterocolitica* strains were able to invade HeLa cells, 88.9% produced ST enterotoxin, and 64.8% evoked severe conjunctivitis in the

guinea pig, without evoking keratitis; there were not differences among the strains isolated from humans and dogs. *Y. frederiksenii* and *Y. intermedia* strains did not show invasion in both tests utilized but all the strains produced ST enterotoxin.

Introdução

O gênero *Yersinia* compreende atualmente, várias espécies (1, 2, 3), sendo que a espécie *Y. enterocolitica* é constituída de 5 biótipos bem definidos (biótipos 1 a 5), de acordo com o esquema de biotipagem proposto por Wauters (21). Alguns biótipos de *Y. enterocolitica* são claramente adaptados ao homem e a certas espécies animais, nos quais manifestam sua patogenicidade, enquanto outros e as espécies *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii*, são usualmente isoladas do meio ambiente (9). Estas três últimas espécies, anteriormente denominadas de yersínias atípicas, bem como os biótipos não adaptados de *Y. enterocolitica*, raramente estão associados a infecções humanas, podendo, entretanto, comportar-se como patógenos oportunistas ou então serem encontrados em indivíduos ou animais sadios (2, 3, 9, 20).

Pouco se conhece sobre os fatores de virulência dos diferentes biosorotipos de *Y. enterocolitica*, bem como das espécies atípicas do gênero. Portanto, o presente trabalho tem por objetivo estudar a habilidade invasora e a produção de enterotoxina ST em alguns biótipos, sorotipos e fagotipos de *Y. enterocolitica* e nas espécies de *Y. intermedia* e *Y. frederiksenii* isoladas, no Brasil, de seres humanos e cães.

Material e Métodos

Amostras - Foram estudadas 58 amostras de *Yersinia*, isoladas de fezes, sendo 15 do homem e 43 de cães na cidade do Rio de Janeiro, no período de 1978 a 1980.

A caracterização das amostras em biótipos, sorotipos e fagotipos foi realizada no Instituto Pasteur de Paris, por especial gentileza do Dr. H.H. Mollaret (Tabela 1). Na determinação do biótipo, foi utilizado o sistema API20 e API50 (Analitab Products Inc.) e os testes bioquímicos adicionais recomendados por Wauters (21). Para a sorotipagem, foram utilizados os 34 soros anti-O de *Y. enterocolitica* (22, 23) e na fagotipagem empregou-se a técnica e os fagos recomendados por Nicolle & col. (10).

Pesquisa de invasibilidade - a. Em células HeLa - Foi utilizado, basicamente, o método descrito por Lee & col. (7), diferindo apenas no fato de que a motilidade das amostras não foi ativada, tendo em vista outros dados publicados (17); **b. Em olho de cobaio** - Foi empregado o método de Serény (15), sendo o inóculo para o teste obtido a partir de amostras cultivadas em "tryptic soy agar" (Difco), incubadas a 25°C, por 48 horas (5). O crescimento bacteriano foi suspenso em salina a 0,85%, de maneira a se obter ao redor de 10^{11} cel./ml, sendo 0,1ml desta suspensão inoculado no saco conjuntival do animal, que foi observado, diariamente, por sete dias.

Pesquisa de enterotoxina termoestável (ST) - Foi realizada de acordo com o método de Dean & col. (4), conforme descrito anteriormente (11). Para o preparo do inóculo, as amostras foram cultivadas, em 25ml de meio (casaminoácidos 2%); extrato de levedura, 1%; glicose, 0,4%; pH 8,5), sob aeração constante, por 48 horas a 25°C. Em seguida, a cultura foi centrifugada sob refrigeração, a 10.000rpm por 20 minutos (12). Foram utilizados seis animais para cada amostra, sendo a leitura do teste realizada 2 e 4 horas após a inoculação. O teste era considerado positivo quando a relação peso dos intestinos/peso das carcaças era $> 0,083$. O teste era repetido quando a relação ficava na faixa compreendida entre 0,080 e 0,082.

Tabela 1 - Características das 58 amostras de *Yersinia* isoladas do homem e de cães na cidade do Rio de Janeiro.

Símbolos: a = Nenhuma amostra provocou ceratite visível a olho nu

Fenótipo	Biótipo	Sorotipo	Lisotipo	Nº de amostras estudadas			Nº de amostras positivas		
				Homem	Cão	Total	HeLa	Serény ^a (conjuntivite)	ST
<i>Y. enterocolitica</i>	1	5	X _Z	2	29	31	31	20	30
	1	6	X _Z	1	1	2	1	0	1
	2	5	X _Z	5	6	11	11	9	9
	4	3	VIII	7	3	10	10	6	8
	<i>Y. enterocolitica</i>			15	39	54	53(98,1%)	35(64,8%)	48(88,9%)
<i>Y. frederiksenii</i>	-	16	X _O	0	3	3	0	0	3
<i>Y. intermedia</i>	-	17	X _O	0	1	1	0	0	1

Resultados

A grande maioria das amostras de *Y. enterocolitica* invadiu células HeLa (98,1%) e produziu enterotoxina ST (88,9%), independentemente de terem sido isoladas do homem ou de cães. No teste de Serény, 24 a 48 horas após a inoculação, 64,8% destas amostras provocaram intensa conjuntivite no cobaio, mas em nenhum animal houve desenvolvimento de ceratite, visível a olho nu. As amostras de *Y. frederiksenii* e *Y. intermedia* mostraram-se não invasoras nos dois testes utilizados, sendo que todas as amostras produziram enterotoxina ST (Tabela 1).

Discussão

Comparando-se os testes de invasão em HeLa e em cobaio (Teste de Serény), conclui-se que o primeiro é mais sensível, para determinar invasibilidade em *Y. enterocolitica*, o que vem confirmar dados publicados anteriormente (17). Tendo em vista este fato, a invasibilidade das amostras será discutida em função do teste em cultura de células HeLa.

Todas as amostras de *Y. enterocolitica*, com exceção de uma do biótipo 1, sorotipo 0:6, lisotipo X_Z, mostraram-se invasoras no teste em cultura de células HeLa. Todas as amostras do biótipo 4, sorotipo 0:3, consideradas adaptadas ao homem (9), foram positivas neste teste. Entretanto, amostras pertencentes aos biótipos 1 e 2, do sorotipo 0:5, consideradas não adaptadas ao homem ou animais (9), e portanto incapazes de causar doença, também mostraram habilidade de invadir células HeLa. Por outro lado, nenhuma das amostras atípicas de *Yersinia* mostrou ser invasora. Estes resultados são coerentes com os obtidos por outros autores, que relatam que a invasão de células HeLa é observada em amostras de *Y. enterocolitica*, consideradas patogênicas para o homem e para animais de laboratório (7, 13, 16, 18, 19), enquanto que as amostras não patogênicas podem ou não invadir estas células (8). Por outro lado, relatam que amostras de *Yersinia*, principalmente isoladas do meio ambiente, como as yersínias atípicas, não apresentam esta característica (6).

No presente estudo, a maioria das amostras de *Y. enterocolitica* (88,9%), assim como todas as yersínias atípicas produziram enterotoxina ST. Entretanto, esta toxina parece não ser um fator relevante na patogenicidade de *Yersinia*, desde que foi possível provocar diarréia em animal de laboratório, utilizando-se amostra não toxigênica, porém invasora (14). Entretanto, este (14) e outros trabalhos (7, 19) não deixam dúvidas sobre a invasibilidade, como mecanismo fundamental de virulência. Neste particular, é evidente a correlação entre os resultados do presente trabalho e a patogenicidade natural, observada no gênero *Yersinia*.

Em relação ao teste de Serény, convém salientar que a infecção ocular ficou restrita à conjuntiva, não havendo comprometimento da córnea, o que já havia sido observado por Toledo & col. (17).

A alta porcentagem de amostras produtoras de enterotoxina ST, encontrada neste

trabalho, pode estar relacionada ao tempo de leitura do teste de Dean, que foi de 2 e 4 horas. Esta conduta, segundo Nunes & Ricciardi (11), permite revelar maior número de amostras positivas no teste.

É interessante ressaltar que, entre as amostras de *Y. enterocolitica*, os mesmos biosorotipos e lisotipos foram encontrados no homem e em cães, não se observando diferenças no comportamento dos dois grupos de amostras em relação aos testes de virulência estudados.

Referências Bibliográficas

- Bercovier, H.; Brenner, D.J.; Ursing, J.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R.; Alonso, J.M.; Carter, G.P. & Mollaret, H.H. - Characterization of *Yersinia enterocolitica* sensu stricto. *Curr. Microbiol.*, 4:201-206, 1980.
- Bercovier, H.; Ursing, J.; Brenner, D.J.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R.; Carter, G.P. & Mollaret, H.H. - *Yersinia kristensenii*: a new species of Enterobacteriaceae composed of sucrose-negative strains (Formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr. Microbiol.*, 4:219-224, 1980.
- Brenner, D.J.; Bercovier, H.; Ursing, J.; Alonso, J.M.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R.; Carter, G.P. & Mollaret, H.H. - *Yersinia intermedia*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (Formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). *Curr. Microbiol.*, 4:207-212, 1980.
- Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
- Feeley, J.C.; Wells, J.G., Tsai, T.F. & Puhr, N.D. - Detection of enterotoxigenic and invasive strains of *Yersinia enterocolitica*. In: - International Symposium on *Yersinia*, 3, Montreal, 1977 - *Yersinia enterocolitica*: biology, epidemiology and pathology. Basel, Karger, p.329-334 (Contribution to microbiology and immunology, v.5), 1979.
- Kapperud, G. - Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like bacteria. 2 - Interaction with HeLa cells among environmental and human isolates from Scandinavia. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect.B, 88:293-297, 1980.
- Lee, W.H.; McGrath, P.P.; Carter, P.H. & Eide, E.L. - The ability of some *Yersinia enterocolitica* strains to invade HeLa cells. *Can. J. Microbiol.*, 23:1714-1722, 1977.
- Maruyama, T.; Ume, T. & Zen-Yoji, H. - Observations on the correlation between pathogenicity and serovars of *Yersinia enterocolitica* by the assay applying cell culture system and experimental mouse infection. In: - International Symposium on *Yersinia*, 3, Montreal, 1977 - *Yersinia enterocolitica*: biology, epidemiology and pathology. Basel, Karger, p.317-323 (Contribution to Microbiology and Immunology, v.5), 1979.
- Mollaret, H.H. - Curso "Yersinia". In: - Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 9, São Paulo, 1983 e Congresso Brasileiro de Microbiologia, 12, São Paulo, 1983.
- Nicolle, P.; Mollaret, H.H. & Brault, J. - Nouveaux résultats sur la lysotypie de *Yersinia enterocolitica* portant sur plus de 4.000 souches d'origines diverses. *Rev. Epidem. Santé publ.*, 24:479-496, 1976.
- Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Detection of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin by suckling mouse bioassay. *J. Clin. Microbiol.*, 13:783-786, 1981.
- Pai, C.H. & Mors, V. - Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.*, 19:908-911, 1978.
- Pedersen, K.B.; Winblad, S. & Bitsch, V. - Studies on the interaction between different O-serotypes of *Yersinia enterocolitica* and HeLa cells. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, Sect.B, 87:141-145, 1979.

14. Schiemann, D.A. - An enterotoxin: negative strain of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3 is capable of producing diarrhea in mice. *Infect. Immun.*, 32:571-574, 1981.
15. Serény, B. - Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: a preliminary report. *Acta Microbiol. Hung.*, 2:293-296, 1955.
16. Shayegani, M.; Morse, D.; DeForge, I.; Root, T.; Parsons, L.M. & Maupin, P.S. - Microbiology of a major foodborne outbreak of gastroenteritis caused by *Yersinia enterocolitica* serogroup O:8. *J. Clin. Microbiol.*, 17:35-40, 1983.
17. Toledo, M.R.F.; Serafim, M.B.; Horton, D.S.P.Q. & Falcão, D.P. - Pesquisa de fatores de virulência em *Yersinia enterocolitica*. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 13:143-150, 1982.
18. Une, T. - Studies on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*. II - Interaction with cultured cells in vitro. *Microbiol. Immunol.*, 21:365-377, 1977.
19. Une, T. & Zen-Yoji, H. - Investigation on the pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* by experimental infections in rabbits and cultured cells. In: - International Symposium on *Yersinia*, 3, Montreal, 1977 - *Yersinia enterocolitica: biology, epidemiology and pathology*. Basel, Karger, p.304-309 (Contribution to Microbiology and Immunology, v.5), 1979.
20. Ursing, J.; Brenner, D.J.; Bercovier, H.; Fanning, G.R.; Steigerwalt, A.G.; Brault, J. & Mollaret, H.H. - *Yersinia frederiksenii*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive strains (Formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica-like*). *Curr. Microbiol.*, 4:213-217, 1980.
21. Wauters, G. - Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Belgium, Université Catholique de Louvain, 165p., 1970. (Thesis).
22. Wauters, G.; Le Minor, L. & Chalon, A.M. - Antigènes somatiques et flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Inst. Pasteur*, 120:631-642, 1971.
23. Wauters, G.; Le Minor, L.; Chalon, A.M. & Lassen, J. - Supplément au schéma antigénique de *Yersinia enterocolitica*. *Ann. Inst. Pasteur*, 122:951-956, 1972.

CONJUNTIVITE POR *NEISSERIA LACTAMICA**

Paulo Fausto Cauduro

Deptº de Bacteriologia

Laboratório Weinmann

Rua Ramiro Barcelos, 910/59

90000 Porto Alegre RS, Brasil

Adelina Mezzari

& Cicero A.G. Dias

Deptº de Bacteriologia

Laboratório Weinmann

Resumo

É relatado o isolamento de *Neisseria lactamica* em secreção conjuntival de recém-nascido; provas de diagnóstico bacteriológico, assim como suscetibilidade aos antibióticos, são apresentadas; a necessidade de cultivo é ressaltada, no sentido de se evitar falso diagnóstico de infecção gonocócica.

Summary

Conjunctivitis due to Neisseria lactamica

Conjunctivitis of newborn due to *Neisseria lactamica* is reported. The bacteriological characteristics and susceptibility to antimicrobial agents of the locally isolated strains are presented. The need of culture is pointed out to avoid erroneous diagnosis of gonococcal infection.

Introdução

Neisseria lactamica faz parte da flora endógena do trato respiratório superior e tem sido raramente associada com doença (20).

Seu habitat primário é o nasofaringe de crianças de três meses a seis anos (8). Os portadores podem estimular a formação de anticorpos que protegem contra doença meningocócica, visto que há reação cruzada entre os dois microrganismos (13, 17).

Apesar de prévio relato de isolamento de neissérias utilizadoras de lactose (12), pequena atenção foi dada a este achado, até os estudos de Hollis & col., no CDC (6), que identificaram, como lactose-positivas, certas amostras suspeitas de meningococos.

Desde então, *Neisseria lactamica* tem sido caracterizada como produtora de beta-galactosidase, degradando a lactose e o ONPG (o-nitrofenol-beta-d-galactopiranosídeo).

O crescimento em meio de Thayer-Martin (19), com 3 a 10% de CO₂, ao lado do crescimento em ágar-sangue ("Trypticase Soy Agar", BBL, com 5% de sangue), aerobicamente, coloca *Neisseria lactamica* a meio termo, quanto ao comportamento, entre as

* Trabalho realizado no Deptº de Bacteriologia, Laboratório Weinmann.

neissérias, reconhecidamente patogênicas (gonococo e meningococo) e as demais espécies. Sua ação sobre lactose e ONPG (11), a caracterizam em definitivo (2, Tabela 1).

Em revisão, apresentada por Herbert & Ruskin (5), não encontramos nenhum relato de conjuntivite causada por *N. lactamica*, sendo, no entanto, verificados casos de isolamento em LCR (4, 10, 21), faringe (3) e pulmão, LCR e líquido amniótico (7); estes últimos de diferentes pacientes sem informação clínica. Recentemente, Shifman & Ryan (15) descreveram *Neisseria lactamica* em hemoculturas de um paciente imunossuprimido. Suassuna & col. (17) são os pioneiros, no isolamento de *N. lactamica* no Brasil, relatando caso em portador, Lee & col. (11) destacam a importância do teste da ONPG, na caracterização deste microrganismo.

No presente trabalho é comunicado o isolamento de *Neisseria lactamica* em um caso de conjuntivite de recém-nascido, apresentando secreção purulenta bilateral.

Material, Métodos e Resultados

A secreção conjuntival foi semeada, como de hábito, em ágar-sangue ("Trypticase Soy Agar", BBL, com 5% de sangue) e submetida a exame microscópico pelo método de Gram. O aspecto do esfregaço corado era altamente sugestivo de *Neisseria gonorrhoeae*: diplococos Gram-negativos extra e intra-cellulares.

Efetuamos semeadura também em meio de Thayer-Martin, incubando as duas placas a 37°C; a de ágar-sangue em aerobiose convencional e a de Thayer-Martin em atmosfera de CO₂ (obtida com a técnica da vela).

O crescimento foi abundante, em ambas as placas. Procedida prova de oxidase, esta resultou fortemente positiva. O Gram, diretamente das colônias, confirmou a presença de diplococos Gram-negativos.

O repique em caldo ("Trypticase Soy Broth", BBL), redundou em crescimento com turvação uniforme, em cerca de 18 horas de incubação. O Gram, a partir deste cultivo, com morfologia típica de grãos de café, em cocos Gram-negativos, afastou a hipótese de *Neisseria gonorrhoeae*, vez que esta não se desenvolve neste caldo. O diagnóstico presuntivo foi assim reformulado.

Como recurso final, aplicamos uma série de testes de fermentação de carboidratos, a fim de chegar à identificação definitiva. Os substratos empregados foram a glicose, maltose e a lactose, além do ONPG, contidos em discos impregnados do sistema "Minitek" (Minitek System, Becton Dickinson & Co., Cockeysville, Md., USA).

A leitura dos testes, acrescida na prova de oxidase e do crescimento em Thayer-Martin, forneceu os seguintes resultados para o microrganismo isolado: Thayer-Martin cresce; oxidase positivo; glicose positivo; sacarose negativo; maltose e lactose positivos e ONPG positivo, comprovando o diagnóstico de *Neisseria lactamica*.

O antibiograma (método de Kirby-Bauer) revelou resistência à penicilina, dicloxacilina e ampicilina; resultado intermediário para as cefalosporinas, tetraciclinas, amicacina e sisomina; e sensibilidade à lincomicina, eritromicina, rifampicina, rifamicina, cloranfenicol, canamicina, gentamicina, cefoxitina, tobramicina e à fosfocina.

Tabela 1 - Diferenciação de algumas espécies de *Neisseria* e *Branhamella*

	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. lactamica</i>	<i>N. subflava</i>	<i>N. mucosa</i>	<i>B. catarrhalis</i>
Oxidase	+	+	+	+	+	+
Cresc. em T. Martin	+	+	+	-	-	-
Utilização carboidr.						
Glicose	+	+	+	+	+	-
Maltose	-	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	+	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	+	-
OnPG	-	-	+	-	-	-

Conclusão

A verificação de diplococos Gram-negativos, intra e extra celulares, em secreções conjuntivais de recém-nascidos, induz, naturalmente, ao diagnóstico de infecção gonococcica.

O isolamento e caracterização de *Neisseria lactamica* no caso relatado, além das observações de Tanner (18) e de Spark (16) que obtiveram resultado semelhante em oftalmias de recém-nascidos, quanto a *Branhamella catarrhalis* (*Neisseria catarrhalis*), justificam o emprego da cultura.

O tratamento das infecções, por *Neisseria lactamica* e por outras neissérias ditas "não patogênicas", tem-se restringido ao uso empírico de penicilina e ampicilina, baseado na eficácia destes antibióticos, em infecções causadas por *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria meningitidis* (5). Contudo, nem todas as amostras de neissérias, ditas "não patogênicas", apresentam sensibilidade à penicilina e à ampicilina, e a cepa de *N. lactamica*, por nós isolada, é resistente a ambos. A amostra de *N. mucosa*, isolada por Dowling & col. (1) era resistente à penicilina; Ninane & col. (14) descrevem uma infecção causada por *Branhamella catarrhalis* (*N. catarrhalis*), resistente à ampicilina. Em contraposição, Kamme (9), avaliando 36 isolamentos de *Branhamella catarrhalis*, em otite média, verificou que todas as amostras apresentavam sensibilidade, tanto à penicilina quanto à ampicilina.

Em conclusão, as neissérias "não patogênicas" podem ser certamente patogênicas, quando comprovado seu isolamento, em casos de meningites, endocardites, septicemias, pneumonias, otites médias, sinusites, uretrites, cervicites (5) e, pelo presente relato, conjuntivites.

Dos dados disponíveis, verifica-se que as amostras isoladas não apresentam suscetibilidade uniforme aos antimicrobianos e infere-se, daí, que a terapêutica deve ser orientada pelos resultados dos testes de sensibilidade.

Referências Bibliográficas

1. Dowling, J.N.; Lee, W.S. & Sacco, R.J. - Endocarditis caused by *Neisseria mucosa* in Marfan's syndrome. Ann. Intern. Med., 81:641-643, 1974.
2. Finegold, S.M. & Martin, W.J. - Diagnostic microbiology. 6.ed. St. Louis, Missouri, C.V. Mosby, cap.19, p.189-197, 1982.
3. Fischer, L.S.; Edelstein, P. & Guze, L.B. - *Neisseria lactamica pharyngitis*. J.A.M.A., 233:22, 1975.
4. Hansman, D. - Meningitis caused by *Neisseria lactamica*. N. Engl. J. Med., 299:491, 1978.
5. Herbert, D.A. & Ruskin, J. - Are the "nonpathogenic" *Neisseria* pathogenic? Am. J. Clin. Path., 75:739-743, 1981.
6. Hollis, D.G.; Wiggins, G.T. & Weaver, R.E. - *Neisseria lactamica* sp.n.: a lactose-fermenting species resembling *Neisseria meningitidis*. Appl. Microbiol., 17:71-77, 1969.
7. Hollis, D.G.; Wiggins, G.T. & Weaver, R.E. - Current status of lactose-fermenting *Neisseria*. Ann. N.Y. Acad. Sci., 174:444-449, 1970.
8. Gold, R.; Goldschneider, I.; Lepow, M.L.; Draper, T.F. & Randolph, M. - Carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in infants and children. J. Infect. Dis., 137:112-121, 1978.
9. Kamme, C. - Evaluation of in vitro sensitivity of *Neisseria catarrhalis* to antibiotics with respect to acute otitis media. Scand. J. Infect. Dis., 2:117-120, 1970.
10. Lauer, B.A. & Fischer, C.E. - *Neisseria lactamica meningitis*. Am. J. Dis. Child., 130:198-199, 1976.
11. Lee, I.M.L.; Pessôa, G.V.A.; Esper, M.R.N.R.; Melles, C.E.A. & Simonsen, V. - A importância do teste CNPG na caracterização da *Neisseria lactamica*. Congresso Brasileiro de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, p.107, 1977.
12. Mitchell, M.S.; Rhoden, D.L. & King, E.O. - Lactose-fermenting organisms resembling *Neisseria meningitidis*. J. Bacteriol., 90:560, 1965.

13. Morello, J.A. & Bohnhoff, M. - *Neisseria* and *Branhamella*. In: - Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler Jr., W.J. & Truant, J.P., eds. - Manual of clinical microbiology. 3.ed. Washington, DC, American Society for Microbiology, cap.9, p.111-130, 1980.
14. Ninane, G.; Joly, J. & Kraytman, M. - Bronchopulmonary infection due to *Branhamella catarrhalis*: 11 cases assessed by transtracheal puncture. Br. Med. J., 1:276-278, 1978.
15. Schifman, R.S. & Ryan, K.J. - *Neisseria lactamica* septicemia in an immunocompromised patient. J. Clin. Microbiol., 17:934-935, 1983.
16. Spark, R.P.; Dahberg, P.W. & La Belle, J.W. - Pseudogonococcal ophthalmia neonatorum: *B. catarrhalis* conjunctivitis. Am. J. Clin. Path., 72:739-743, 1981.
17. Suassuna, I.; Lourenço, N.J.; Andrade, J.R.C. & Pereira, A.A. - *Neisseria lactamica* em portador: causa de erro no diagnóstico de meningococos. Rev. Bras. Pathol. Clin., 11:32, 1975.
18. Tanner, E.I. - Neonatal conjunctivitis. Br. Med. J., 2:530, 1972.
19. Thayer, J.D. & Martin, J.E. - A selective medium for the cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitis*. Public Health Rep., 79:49-57, 1964.
20. Washington, J.A. - Laboratory procedures in clinical microbiology. New York, Springer-Verlag, cap. 4, section 4.2 II, p.157-161, 1981.
21. Wilson, H.D. & Overman, T.L. - Septicemia due *Neisseria lactamica*. J. Clin. Microbiol., 4:214-215, 1976.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM AMOSTRAS DE *SHIGELLA* ISOLADAS NO RIO DE JANEIRO*

Lúcia Martins Teixeira

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

Ivone Rocco Suassuna

Hospital Universitário UFRJ
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

& Italo Suassuna

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

Resumo

Foram realizados testes de sensibilidade a 18 diferentes antimicrobianos, pela técnica de difusão em gel de ágar, em 175 amostras de *Shigella*, isoladas de coprocultura de pacientes com gastroenterite de intensidade variável, na cidade do Rio de Janeiro, no período de 1960 a 1978. Os resultados obtidos com 89 amostras, isoladas entre 1960 e 1969 foram comparadas com os de 85 amostras isoladas entre 1970 e 1978. Foi demonstrada uma elevada frequência de amostras resistentes à eritromicina (87,4%), sulfadiazina (73,1%) e estreptomicina (64,6%). Todas as amostras apresentaram-se sensíveis à gentamicina, tobramicina, polimixina e nitrofurantoína. Uma acentuada sensibilidade foi também observada em relação à neomicina, kanamicina, cloranfenicol, colistina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina e ácido nalidíxico. Foi verificado um aumento expressivo da resistência à tetraciclina, estreptomicina, sulfadiazina e cloranfenicol entre as amostras isoladas no período de 1970 a 1978, em relação ao observado entre aquelas isoladas no período anterior. Foi constatada a ocorrência de 39 diferentes modelos de resistência a antimicrobianos, dos quais os 5 de maior frequência, em ordem decrescente, foram: eritromicina (17,1%), eritromicina + sulfadiazina + estreptomicina (17,1%), eritromicina + sulfadiazina + estreptomicina + amicacina (6,9%), eritromicina + sulfadiazina + estreptomicina + sulfametoazol - trimetropim (6,9%) e eritromicina + sulfadiazina (6,3%). Houve predominância de amostras simultaneamente resistentes a 3 (26,9%) e 4 (21,1%) antimicrobianos. A resis-

* Trabalho realizado no Deptº de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia UFRJ. Parte da tese de mestrado do primeiro autor.

tência a um só antimicrobiano, foi observada em 37 amostras (21,1%), sendo verificado um aumento da multirresistência e da diversidade de modelos de resistência nas amostras isoladas no segundo período.

Summary

*Antimicrobial susceptibility tests in *Shigella* strains isolated in Rio de Janeiro*

The susceptibility of 175 *Shigella* strains to 18 antimicrobial agents was assayed by agar disk diffusion tests. All strains were isolated from patients with acute or chronic enteric disorders in Rio de Janeiro from 1960 to 1978. The higher frequencies of resistance were found to erythromycin (87.4%), sulphadiazine (73.1%) and streptomycin (64.6%). On the other hand, all strains were susceptible to gentamicin, tobramycin, polimixin and nitrofurantoin. Sensitivity above 90.0% was found to be related to neomycin, kanamycin, chloramphenicol, colistin, ampicillin, carbenicillin, cephalothin and nalidixic acid. A significant increase in resistance to tetracycline, streptomycin, sulphadiazine and cloramphenicol was observed by comparing the strains isolated up to 1969 and afterwards. A variety of 39 different resistance patterns was found. Single resistance to erythromycin (17.1%) and resistance to erythromycin + sulphadiazine + streptomycin (17.1%), erythromycin + sulphadiazine + streptomycin + amicacyn (6.9%), erythromycin + sulphadiazine + streptomycin + trimethoprim-sulfamethoxazole (6.9%) and erythromycin + sulphadiazine (6.3%) were the most frequent patterns. Simultaneous resistance to three (26.9%) and four (21.1%) different drugs prevailed besides 37 strains (21.4%) which were resistant to only one antimicrobial agent. There was an increase of multiresistance and a different distribution of resistance patterns when the most recent group of strains was compared with the formerly isolated one.

Introdução

A frequência crescente de *Shigella* resistentes a antimicrobianos, em particular as amostras multirresistentes, torna-se um problema mundial com repercussões terapêuticas e epidemiológicas. Devido a isso, vários estudos clínicos e bacteriológicos têm sido desenvolvidos, no sentido de determinar a eficácia de novos quimioterápicos e antibióticos para tratamento da shigelose (4, 5, 6, 7, 11).

A análise da literatura relacionada a investigações sobre o padrão de resistência de amostras de *Shigella* isoladas no Brasil, permite constatar o aumento progressivo da ocorrência da resistência múltipla, assim como a diversidade dos modelos de resistência (12, 13, 14, 22, 24, 27).

Considerando a importância do conhecimento e constante avaliação dos padrões de resistência a antimicrobianos das amostras de *Shigella* predominantes numa determinada região e a raridade de informes disponíveis sobre amostras isoladas no Rio de Janeiro, realizamos testes de sensibilidade a antimicrobianos em amostras isoladas nesta cidade, no período de 1960 a 1978. Apresentamos os modelos de resistência e procuramos evidenciar a ocorrência de possíveis alterações nos padrões de resistência de amostras isoladas em diferentes períodos.

Tabela 1 - Suscetibilidade a antimicrobianos em 157 amostras de *Shigella* isoladas na cidade do Rio de Janeiro no período de 1960 a 1978

Antimicrobianos	Percentagem de amostras							
	Total		Em diferentes períodos					
	1960 - 1978	S	R	1960 - 1969	S	R	1970 - 1978	S
Gentamicina	100,00	-	-	100,00	-	-	100,00	-
Tobramicina	100,00	-	-	100,00	-	-	100,00	-
Polimixina	100,00	-	-	100,00	-	-	100,00	-
Nitrofurantoina	100,00	-	-	100,00	-	-	100,00	-
Cefalotina	99,43	0,57	100,00	-	-	-	98,84	1,16
Carbenicilina	99,43	0,57	100,00	-	-	-	98,84	1,16
Ácido Nalidixico	98,86	1,14	97,75	2,25	100,00	-	-	-
Ampicilina	98,86	1,14	100,00	-	-	-	97,67	2,23
Colistina	97,71	2,29	96,63	3,37	98,84	-	-	-
Kanamicina	95,43	4,57	97,75	2,25	93,02	6,98	-	-
Neomicina	94,86	5,14	97,75	2,25	91,86	8,14	-	-
Cloranfenicol	91,43	8,57	100,00	-	-	-	82,56	17,44
Amicacina	84,00	16,00	85,39	14,61	82,56	17,44	-	-
Sulfametoazol/ Trimetoprim	83,43	16,57	87,64	12,36	79,07	20,93	-	-
Tetraciclina	76,00	24,00	93,26	6,74	58,14	41,86	-	-
Estreptomicina	35,43	64,57	48,31	51,69	22,09	77,91	-	-
Sulfadiazina	26,86	73,14	37,08	62,92	16,28	83,72	-	-
Eritromicina	12,57	87,43	14,61	85,39	10,47	89,53	-	-

Tabela 2 - Resistência a antimicrobianos em 175 amostras de *Shigella* isoladas na cidade do Rio de Janeiro: distribuição entre os diferentes subgrupos e tipos sorológicos

Subgrupo	Sorotípico	total de amostras	Antimicrobianos											
			Er	Su	Es	Te	St	Am	Cl	Ne	Ka	Co	Ap	An
A	A ₂	4	4	4	4	2	-	1	-	-	-	-	-	-
	A não sorotipável	3	2	3	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-
B	B ₁	21	20	16	18	9	5	5	1	4	4	-	-	-
	B ₂	47	42	38	33	10	12	11	5	1	1	1	1	1
	B ₃	28	20	26	17	13	5	2	5	1	-	1	1	1
	B ₄	6	4	5	5	2	2	3	-	-	-	1	1	1
	B ₅	2	2	2	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-
	B ₆	2	2	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-
	B _x	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
	B não sorotipável	5	4	3	5	1	-	2	-	-	-	-	-	-
C	C ₅	2	2	2	2	2	-	-	-	2	1	-	-	-
	C não sorotipável	8	6	6	4	-	1	1	-	-	1	1	-	-
D	D	46	44	21	20	2	3	2	3	1	1	-	-	-
Total de amostras		175	153	128	113	42	29	28	15	9	8	4	2	2
														1

Material e Métodos

Amostras bacterianas - Foram utilizadas 175 amostras de *Shigella* isoladas de coprocultura de pacientes com gastroenterite aguda de intensidade variável ou história de diarréia crônica, na cidade do Rio de Janeiro, no período de 1960 a 1978. Desse total, 7 pertenciam ao subgrupo A (*S. dysenteriae*); 112 ao subgrupo B (*S. flexneri*); 10 ao subgrupo C (*S. boydii*) e 46 ao subgrupo D (*S. sonnei*). Para a análise dos resultados, as amostras foram divididas em 2 grupos, de acordo com a época de isolamento: um grupo (89 amostras) isolado entre 1960 e 1969 e outro (86 amostras) isolado entre 1970 e 1978.

Determinação da suscetibilidade a antimicrobianos - Os testes de suscetibilidade foram realizados pela técnica de difusão em gel de ágar, seguindo-se as recomendações habituais para a sua execução (1, 2). Foram empregados discos de fabricação Oxoid, impregnados com os 18 antimicrobianos relacionados na Tabela 1.

Resultados

Os resultados dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos em 175 amostras de *Shigella* são apresentados na Tabela 1. Foi observada uma elevada frequência de resistência a eritromicina (87,40%), sulfadiazina (73,10%) e estreptomicina (64,60%). Para os demais antimicrobianos, a resistência foi constatada em menos de 25,00% das amostras, ou não ocorreu. Foi observado um aumento expressivo das percentagens de resistência a tetraciclina, estreptomicina, sulfadiazina e ao cloranfenicol entre as amostras de isolamento mais recente.

A Tabela 2 apresenta a distribuição da resistência aos antimicrobianos, segundo os diversos subgrupos e tipos sorológicos de *Shigella* analisados. Acima de 50% das amostras dos sorotipos B₁, B₂ e B₃ apresentaram resistência a eritromicina, sulfadiazina e estreptomicina. Índices dessa natureza foram encontrados no subgrupo D apenas em relação a eritromicina. A resistência foi também expressiva para a sulfadiazina (45,60%) e estreptomicina (43,50%) no subgrupo D e tetraciclina nos sorotipos B₁ (42,90%) e B₃ (46,40%).

Os 39 diferentes modelos de resistência encontrados, estão relacionados na Tabela 3. Para a elaboração desses modelos, foram considerados os antimicrobianos, para os quais cada amostra foi simultaneamente resistente. Houve predominância de amostras simultaneamente resistentes a 3 (26,9% das amostras), 1 (21,1%) e 4 (21,1%) antimicrobianos. Foi verificado um aumento da multirresistência e da diversidade de modelos de resistência entre as amostras isoladas no 2º período.

Os modelos de resistência de maior frequência em ordem decrescente, foram: Er. (17,1%), Er.Su.Es. (17,1%), Er.Su.Es.Am. (6,9%), Er.Su.Es.St. (6,9%) e Er.Su. (6,3%). Para os demais modelos houve grande dispersão, como pode ser notado na Tabela 4. Conforme pode ser observado na Tabela 5, constatou-se a predominância de resistência simultânea a 4 (27,7%), 3 (25,0%) e 2 (15,2%) antimicrobianos no subgrupo B; a 1 (47,8%) e 3 (28,3%) no subgrupo D e a 3 (40,0%) e 4 (57,1%), respectivamente nos subgrupos C e A.

Discussão

Nossos resultados revelam para o Rio de Janeiro, a ocorrência crescente de resistência em amostras do gênero *Shigella*, anteriormente observado nesta cidade (12) e em outras localidades brasileiras (10, 13, 14, 24, 27). Os isolamentos realizados entre 1970 e 1978, mostraram um aumento acentuado de resistência a tetraciclina, estreptomicina, sulfadiazina e cloranfenicol, sendo que o aumento da população resistente, foi uma constante em relação a maioria dos antimicrobianos testados. A

Tabela 3 - Frequência dos diferentes modelos de resistência a antimicrobianos encontrados em 175 amostras de *Shigella* isoladas na cidade do Rio de Janeiro no período de 1960 a 1978

Modelos de resistência	Nº de amostras		Total	
	1960-1969	1970-1978	Nº	%
Er.Su.Es.Te.Am.Ka.Ne	-	1	1	0,57
Er.Su.Te.Cl.Ap.Ca	-	1	1	0,57
Er.Su.Es.Te.Ka.Ne	1	4	5	2,86
Er.Su.Es.Te.St.Am	1	3	4	2,29
Er.Su.Es.Te.Cl	-	3	3	1,71
Er.Su.Es.Te.Am.Cl	-	1	1	0,57
Er.Su.Es.St.Ka.Ne	-	1	1	0,57
Er.Su.Es.Te.Cl	-	7	7	4,00
Er.Su.Es.St.Am	1	1	2	1,14
Er.Su.Es.Te.Am	-	1	1	0,57
Er.Su.Es.Te.Ne	-	1	1	0,57
Er.Su.Es.Am.Ka	1	-	1	0,57
Er.Es.Te.Am.Cl	-	1	1	0,57
Er.Su.Es.Am	7	5	12	6,86
Er.Su.Es.St	5	7	12	6,86
Er.Su.Es.Te	2	6	8	4,57
Er.Es.Co.An	1	-	1	0,57
Er.Co.Ap.Ce	-	1	1	0,57
Su.Es.Te.St	-	1	1	0,57
Su.Te.Co.An	1	-	1	0,57
Su.Es.St.Am	-	1	1	0,57
Er.Su.Es	16	14	30	17,14
Er.Su.St	3	1	4	2,29
Er.Es.Am	2	2	4	2,29
Er.Su.Te	-	3	3	1,71
Su.Es.Te	1	1	2	1,14
Er.Su.Ne	1	-	1	0,57
Er.Te.Cl	-	1	1	0,57
Su.Es.St	-	1	1	0,57
Su.Es.Cl	-	1	1	0,57
Er.Su	8	3	11	6,30
Su.Es	2	4	6	3,43
Er.Es	5	-	5	2,86
Er.Te	-	1	1	0,57
Su.St	1	-	1	0,57
Er	22	8	30	17,14
Su	5	-	5	2,86
Es	1	-	1	0,57
Co	1	-	1	0,57
-	1	-	1	0,57

expressiva resistência a eritromicina, sobretudo no grupo D, é concordante com os resultados obtidos por Montelli (10), em Botucatu, e contrasta com os de Trabulsi, Montelli & Zuliani (23) e de Silveira & col. (18), estes no Rio de Janeiro. Não foi observada resistência a gentamicina, tobramicina, polimixina e nitrofurantoína, devido talvez à sua utilização mais restrita. A alta percentagem de sensibilidade "in vitro" a neomicina, kanamicina, cloranfenicol, colistina, ampicilina, carbenicilina, cefalotina e ácido nalidíxico observada, foi superior àquela encontrada por Zuliani & Trabulsi (27) e por Pessoa & col. (13), em relação a neomicina; por Ricossé (16), Montelli (10), Mero (8) e Pessoa & col. (13) em relação a kanamicina e por Pessoa & col. (13) em relação a colistina, cefalotina e ácido nalidíxico, sendo inferior à encontrada por Trabulsi, Zuliani & Toledo (24) e por Montelli (10) para a cefalotina; por Trabulsi, Zuliani & Toledo (24), para o ácido nalidíxico e por Mero (8), para a neomicina.

Tabela 4 - Frequência de modelos de resistência a antimicrobianos entre os diferentes sorotipos de 175 amostras de *Shigella* isoladas na cidade do Rio de Janeiro no período de 1960 a 1978

Modelos de resistência	Frequência por sorotipo										Total
	A não sorot.	B ₁	B ₂	B ₃	B ₄	B ₅	B ₆	B _x	B não sorot.	C ₅	
Er.Su.Es.Te.Am.Ka.Ne	1										1
Er.Su.Es.Te.Cl.Ap.Ca				1							1
Er.Su.Es.Te.Ka.Ne	3	1							1		5
Er.Su.Es.Te.St.Am	2		1	1							4
Er.Su.Es.Te.St.Cl		2	1								3
Er.Su.Es.Te.Am.Cl			1								1
Er.Su.Es.St.Ka.Ne										1	1
Er.Su.Es.Te.Cl	1		3			1				2	7
Er.Su.Es.St.Am		1	1								2
Er.Su.Es.Te.Am	1								1		1
Er.Su.Es.Te.Ne									1		1
Er.Su.Es.Am.Ka									1		1
Er.Es.Te.Am.Cl			1								1
Er.Su.Es.Am	1	1	6		1	1		1		1	12
Er.Su.Es.St		1	2	6	2					1	12
Er.Su.Es.Te	2			2	2	1		1			8
Er.Es.Co.An				1							1
Er.Co.Ap.Ce					1						1
Su.Es.Te.St				1							1
Su.Te.Co.An					1						1
Su.Es.St.Am					1						1
Er.Su.Es	1	1	3	8	3			1	1	3	30
Er.Su.St						1		1		1	4
Er.Es.Am				2				1			4
Er.Su.Te			1	2							3
Su.Es.Te					2						2
Er.Su.Ne					1						1
Er.Te.Cl				1							1
Su.Es.St			1								1
Su.Es.Cl									1		1
Er.Su		1	4	2	1				3		11
Su.Es	1		2	1	1				1		6
Er.Es		3							2		5
Er.Te		1									1
Su.St			1								1
Er	1	4	1		1			1	22		30
Su		1	3					1			5
Es							1				1
Co									1		1
Sensível				1							1

Embora o aumento da incidência de amostras de *Shigella* resistentes a ampicilina seja descrito quase que mundialmente (5, 17), esta demonstrou uma boa atuação "in vitro" sobre as amostras analisadas. A baixa frequência de amostras resistentes a kanamicina e neomicina, é concordante com os resultados anteriormente relatados para o Rio de Janeiro (12) e para o Japão (25). Índices mais elevados foram descritos para as amostras isoladas em São Paulo (3, 13, 14). É surpreendente, no entanto, a percentagem total de 16% de amostras resistentes à amicacina, entre os aminoglico-

sídeos testados, com variação discreta entre os dois períodos comparados. O fato, sem dúvida, serve de alerta contra a divulgação de serem desprezíveis os problemas de resistência com este antibiótico, comparado aos demais aminoglicosídeos (15). Em relação a resistência ao cloranfenicol, dados sobre amostras isoladas no Japão (25), em São Paulo (10, 14, 24, 27) e Rio de Janeiro (12), indicam a sua presença frequente nos principais modelos de resistência. Entretanto, isto foi bem menos evidente na nossa amostragem. De um modo geral, nossas amostras apresentaram-se menos resistentes aos antimicrobianos do que as estudadas por Zuliani & Trabulsi (27) e Pessoa & col. (13), em São Paulo.

Analizando a suscetibilidade a antimicrobianos nos diferentes subgrupos e sorotipos de *Shigella*, verificou-se que a proporção de amostras resistentes não foi em geral, uniforme, cabendo, entretanto, alguns comentários. Os sorotipos B₁, B₂ e B₃ apresentaram altos índices de resistência à eritromicina, sulfadiazina e estreptomicina. A maioria do total de amostras monorresistentes (59,5%), pertencia ao subgrupo D e apenas 40,5% aos subgrupos restantes. Resultados similares foram obtidos com amostras de *Shigella*, isoladas na França, durante 1966 e 1967 (19).

Outra dimensão do problema, é conferida pela análise dos modelos de resistência das amostras. A resistência exclusiva (monorresistência), foi observada em 21,1% do total de amostras, sendo mais comum (32,6%) entre aquelas isoladas no 1º período e rara (9,3%), entre aquelas do 2º período. A maioria das amostras apresentou resistência simultânea a 2 ou mais dos antimicrobianos testados, até o máximo de 7. O número relativamente elevado de amostras resistentes a 3 ou mais antimicrobianos (64,6%), teve incluídos em seus modelos de resistência, em ordem de frequência: a eritromicina, a sulfadiazina e a estreptomicina, seguidas, em menor escala, de tetraciclina e amicacina. Deve ser ressaltada a elevação do número de amostras simultaneamente resistentes a 4 ou mais antimicrobianos, no 2º período, contrastando com a baixa frequência entre aquelas do 1º período. Tais modificações assemelham-se não só às encontradas em outras cidades brasileiras (14, 24), como também, às registradas por autores estrangeiros (9, 25), diferindo, porém, quanto aos modelos de resistência. No Japão, tem sido frequentemente descrita a resistência simultânea a 4 antimicrobianos, envolvendo a sulfadiazina, a estreptomicina, a tetraciclina e o cloranfenicol (25). Também na França foi observada uma grande variedade de modelos de resistência, sendo que o número de antimicrobianos envolvidos, raramente passava de 4 (20), predominando a resistência a estreptomicina, sulfadiazina e tetraciclina. Para São Paulo (14, 24), assim como, para o Rio de Janeiro (12), foram relatados modelos envolvendo a resistência a sulfadiazina, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e kanamicina. A resistência exclusiva a sulfadiazina, foi rara entre nossas amostras.

A comparação dos nossos resultados com os de estudos semelhantes, apresenta certas limitações, uma vez que os antimicrobianos utilizados nem sempre foram os mesmos e o grau de uso, varia de região para região. Entretanto, muitos dos aspectos por nós observados, assemelham-se àqueles obtidos em outros estados e países, nos quais a inexistência de uma correlação entre os modelos de resistência e os sorotipos envolvidos, tanto quanto a presença de resistência a sulfadiazina, estreptomicina e tetraciclina, são achados constantes. Também a diminuição do número de amostras de *Shigella* resistentes a um antimicrobiano, a elevada frequência de amostras multirresistentes e a grande diversidade de modelos de resistência, particularmente entre as amostras de isolamento mais recente, é notável, assim como, o fato da resistência múltipla estar quase sempre associada a resistência à sulfadiazina.

Tabela 5 - Frequência de resistência a 1 ou mais antimicrobianos entre os diferentes subgrupos de *Shigella* isolados na cidade do Rio de Janeiro entre 1960 e 1978

Nº de anti-microbianos	Nº de amostras por subgrupo				Nº	%
	A	B	C	D		
0	-	1	-	-	1	0,57
1	-	12	3	22	37	21,14
2	1	17	-	6	24	13,71
3	2	28	4	13	47	26,86
4	4	31	-	2	37	21,14
5	-	9	2	2	13	7,43
6	-	12	1	1	14	8,00
7	-	2	-	-	2	1,14
Total	7	112	10	46	175	100,00

Acredita-se que a ação seletiva, desenvolvida pelo uso intensivo de antimicrobianos, possa ser responsável pela grande disseminação e variedade de resistência observada (21). O desenvolvimento frequente de infecções causadas por microrganismos do gênero *Shigella*, apresentando multirresistência de extrema diversidade, permite prever as dificuldades encontradas quando da necessidade de utilização de antimicrobianos, exigindo, portanto, cuidadosa seleção e controle.

Agradecimentos

Desejamos expressar o nosso reconhecimento pelo valioso auxílio técnico de Selma da Silva Pinto e Maria Angélica Pereira da Silva.

Trabalho realizado com o apoio financeiro da CAPES, CNPq, FINEP e CEPG-UFRJ.

Referências Bibliográficas

1. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
2. Ericsson, H.M. & Sherris, J.C. - Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. Acta Pathol. Microbiol. Scand. (Sec. B Suppl.), 217:1-90, 1971.
3. Fernandes, M.R. & Trabulsi, L.R. - Infectious resistance in pathogenic organisms isolated in São Paulo. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10:52-53, 1968.
4. Haltalin, K.C.; Nelson, J.D.; Hinton, L.V.; Kusmiesz, H.T. & Sladoje, M. - Comparison of orally absorbable and nonabsorbable antibiotics in shigellosis: a double-blind study with ampicillin and neomycin. J. Pediat., 72:708-720, 1968.
5. Haltalin, K.C.; Nelson, J.D. & Kusmiesz, H.T. - Comparative efficacy of nalidixic acid and ampicillin for severe shigellosis. Arch. Dis. Child., 48:305-312, 1973.
6. Haltalin, K.C.; Nelson, J.D.; Ring III, R.; Sladoje, M. & Hinton, L.V. - Double-blind treatment study of shigellosis comparing ampicillin, sulfadiazine and placebo. J. Pediat., 70:970-981, 1967.
7. Lexomboon, V.; Mansuwan, P.; Duangmanee, C.; Benjadol, P. & M'cMinn, M.T. - Clinical evaluation of co-trimoxazole and furazolidone in treatment of shigellosis in children. Brit. Med. J., 2:23-26, 1972.
8. Mero, E. - Resistance to antibiotics of *Shigella* strains isolated in Somalia. Bull. Hlth. Org., 54:473-474, 1976.
9. Mitsuhashi, S. - The R factor: review. J. Infec. Dis., 119:89-100, 1969.
10. Montelli, A.C. - Diarréias por enterobactérias: estudo bacteriológico, clínico e epidemiológico. São Paulo, Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, 1972. (Tese).
11. Nelson, J.D. & Haltalin, K.C. - Comparative efficacy of cephalexin and ampicillin for shigellosis and other types of acute diarrhea in infants and children. Antimicrob. Agents Chemother., 7:415-420, 1975.
12. Palmeira, M.L.; Batalha, P.P. & Gomes, V.L.P. - Sobre o aparecimento de resistência multipla aos antimicrobianos e quimioterápicos em amostras de *Shigella* isoladas no Rio de Janeiro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 69:145-152, 1971.
13. Pessoa, G.V.A.; Calzada, C.T.; Peixoto, E.S.; Melles, C.E.A.; Kano, E.; Raskin, M.; Simonsen, V. & Irino, K. - Ocorrências de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no setembro 1970-76. III - Sorotipos de *Shigella* de *Escherichia coli* da gastroenterite infantil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:129-139, 1978.
14. Piéchaud, D.; Szturm-Rubinstein, S. & Pessoa, G. - Diversité des types de résistance de *Shigella* observés à São Paulo (Brésil). Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 125B:581-584, 1974.
15. Price, K.E.; Kresel, P.A.; Farchione, L.A.; Siskin, S.B. & Karpow, S.A. - Estudos epidemiológicos de resistência aos aminoglicosídeos realizados nos EUA. J. Brasil. Med. (Edição Suplementar) Parte 1:30-38, 1982.

16. Ricossé, J.H. - Contribution à l'étude des shigelloses au Sud Viêt Nam (étude bactériologique et thérapeutique). Bull. Soc. Path. Exot., 61:699-721, 1968.
17. Ross, S.; Contrioli, G. & Khan, W. - Resistance of *Shigella* to ampicillin and other antibiotics: its clinical and epidemiological implications. J. Am. Med. Assoc., 221:45-47, 1972.
18. Silveira, M.H. da; Suassuna, I.; Pinto, C.A.M. & Valeiro, J.F. - Ação "in vitro" do estearato de eritromicina sobre *Shigella* e grupos enteropatogênicos de *Escherichia coli*. Hospital, 75:1913-1926, 1969.
19. Szturm-Rubsten, S.; Piéchaud, D. - Resistance aux antibiotiques de 150 souches de *Shigella* isolée en France. Ann. Inst. Pasteur, 113:464-468, 1967.
20. Szturm-Rubsten, S.; Piéchaud, D. & D'Hauterville, H. - Antibiorésistance des *Shigella* isolée en France en 1971: modifications et caractérs stables. Ann. Inst. Pasteur, 123:307-310, 1972.
21. Sturtevant Jr., A.B.; Cassell, G.H.; Bobo, R.A. & Feary, T.W. - Effect of antibiotic treatment on the incidence of infectious drug resistance among intestinal lactose-fermenting bacteria isolated from burn patients. Infect. Immun., 3:411, 1979.
22. Toledo, M.R.F.; Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. - Single and multiple transferable drug resistance among clinically isolated *Shigella* strains. Rev. Microbiol. (São Paulo), 1:1-11, 1970.
23. Trabulsi, L.R.; Montelli, A.C. & Zuliani, M.E. - Estudos sobre a sensibilidade de shigelas ao estearato de eritromicina. Folha Médica, 55:331-336, 1967.
24. Trabulsi, L.R.; Zuliani, M.E. & Toledo, M.R.F. - Resistance to nine drugs of *Shigella* strains in São Paulo, between 1963 and 1968. Rev. Microbiol. (São Paulo), 1:71-77, 1970.
25. Watanabe, T. - Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bacteriol. Rev., 87:115, 1963.
26. Watanabe, T. - Infectious drug resistance in enteric bacteria. New Engl. J. Med., 275:888-894, 1966.
27. Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. - Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a 5 antibióticos de 166 amostras de *Shigella*, isoladas em São Paulo, Brasil. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 10:70-77, 1968.

PILI E ADERÊNCIA PARA CÉLULAS HE LA EM ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÊNICAS

João Ramos Costa Andrade

Gerson Affonso Caniné

Lúcia Simas Parentoni

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

& Milden Rodrigues de Santa Rosa

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

Resumo

Estudo de 18 amostras de *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC) dos sorogrupo 0111:K58(9), 0119:K69(3), 086:K61(3), 055:K59(2) e 0124:K72(1) isoladas de surtos epidêmicos e de casos esporádicos de diarréia, e 14 amostras de *E. coli* não EPEC, isoladas das fezes de indivíduos saudáveis. Identificam-se as hemaglutininas manose-sensíveis (HAMS) e manose-resistentes (HAMR) por testes em lâmina e microplaca utilizando diferentes condições de cultivo e espécies de hemácias (cobaio, ave, bovinas, coelho, carneiro e humanas). Todas as amostras foram examinadas em microscopia eletrônica (M.E.) por contrastação negativa e suspensões bacterianas piliadas (PIL⁺) ou não (PIL⁻) foram testadas quanto à aderência para células HeLa, por ensaio quantitativo, sendo determinado um índice de aderência (I.A.). Pili tipo 1 é produzido pela maioria das EPEC epidêmicas (85%) e *E. coli* não EPEC (78%), contrastando com as EPEC esporádicas (27%). Não foram detectados padrões hemaglutinantes associados a sorogrupo ou origem das amostras, nem observados pili manose-resistentes em qualquer das EPEC, embora cerca de 28% delas produzam HAMR, evidenciada por testes em microplaca. Em todos os grupos (epidêmicas, esporádicas e não EPEC), houve maior aderência a células HeLa nas amostras produtoras de pili tipo 1, sem contudo ocorrerem diferenças significativas entre os I.A. de EPEC epidêmicas e *E. coli* não EPEC. As EPEC esporádicas, majoritariamente PIL⁻ apresentaram baixos I.A.

Summary

Pili and adherence to HeLa cells in enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) from outbreaks and sporadic cases of infantile enteritis

Eighteen EPEC strains of serogroups 0111:K58(9), 0119:K69(3), 086:K61(3), 055:K59(2) and 0124:K72(1) obtained from epidemic outbreaks and sporadic cases in Rio de Janeiro were studied regard pili production and adherence to HeLa cells. Fourteen non EPEC *E. coli* strains isolated from stools of healthy children were also studied. Hemagglutination tests were carried out in slide and microplates, at 4°/37°C with human (A and B groups), bovine, guinea-pig, sheep and fowl erythrocytes to which 0.5% D-mannose, depending upon the experiment was either added or not. All strains were examined by electron microscopy (negative staining) to search for pili. A quantitative adherence test with HeLa cells were used to evaluate adherence of EPEC and non EPEC *E. coli* with or without pili. Higher rates of type 1 pili-producing strains (PIL⁺) were observed among "epidemic" EPEC (85%) and non EPEC *E. coli* (78%) than "sporadic" EPEC (27%). No correlation was found between hemagglutination patterns and serogroup or source of strains. With regard to mannose-resistant pili no positive strain was found despite 28% of all EPEC strains produced mannose-resistant hemagglutination (MRHA) when tested in microplates. Higher adherence indexes to HeLa cells were verified among PIL⁺ strains of all groups ("epidemic", "sporadic" and non EPEC) although no quantitative differences were apparent among "epidemic" EPEC and non EPEC *E. coli*. The attachment of "sporadic" EPEC to HeLa cells was worse than that observed for the other groups of *E. coli*.

Introdução

Certos sorogrupos de *Escherichia coli* (enteropatogênicos "clássicos" ou EPEC) são associados à diarréia infantil (11, 16). Em nosso meio, ocorrem tanto em surtos epidêmicos intra-hospitalares, quanto, endémicamente, na comunidade. Em São Paulo, verificou-se a participação em cerca de 14% das diarréias agudas de lactentes, predominando os sorogrupos 0111, 055 e 0119 (15). No Rio de Janeiro, em surtos e casos esporádicos, ocorridos entre 1978 e 1980, mostrou-se o predomínio, em ambas as situações epidemiológicas, dos sorogrupos 0111, 0119 e 086 (Suassuna I.; Suassuna, I.R. & Pereira, A.A., 1983 - dados não publicados).

A enteropatogenicidade das EPEC não parece relacionar-se à invasividade ou produção de LT e/ou ST, a despeito de achados recentes, sugerindo ação enterotóxica (19). Contudo, a colonização das mucosas parece ser importante, para o estabelecimento e rápida disseminação da infecção, sendo relatada intensa colonização da boca, orofaringe e rinofaringe de crianças diarréicas e de atendentes clínicos envolvidos com estes pacientes (16).

A aderência das *E. coli* a hemácias e células epiteliais, relaciona-se a estruturas proteicas, denominadas fimbrias (6) ou pili (2), classificados em pili tipo 1, causadores de hemaglutinação manose-sensível (HAMS) e pili manose-resistentes, causadores de hemaglutinação manose-resistente (HAMR). Estes últimos, em *E. coli* entero-toxigenicas, são denominados "fatores de colonização" (9), sendo, igualmente, encontrados em amostras isoladas de infecções extra-intestinais (17), especialmente infecções urinárias (8). Também é descrita HAMR não-associada a pili (7, 12), causada por "hemaglutininas não-fimbriais" cujo papel, na virulência, é desconhecido.

Em EPBC, pili tipo 1 foram encontrados por O'Hanley & Cantey (18), enquanto Duguid (5) verificou que 26% das EPEC eram apiladas, concluindo pelo papel discutível destas estruturas na virulência. Por outro lado, Evans & col. (10) descrevem padrão HAMS, fortemente associado a EPEC, sugerindo que tal hemaglutinação (HA) se deve ao pili tipo 1.

Nesse trabalho, estudamos EPEC de alguns dos sorogrupos mais frequentes, isolados de surtos epidêmicos, em berçário e de casos esporádicos, na população geral. As

amostras foram inicialmente mapeadas, quanto a estruturas adesivas, por testes de HA e testadas com células HeLa, por ensaios quantitativos de aderência.

Material e Métodos

Amostras - Provieram de três surtos de diarréia ocorridos entre 1977-1978, no Hospital das Clínicas da UERJ e de crianças diarréicas, atendidas no ambulatório daquele Hospital ou em laboratórios privados. Amostras de *E. coli* não EPEC foram isoladas das fezes de indivíduos saudáveis. Logo após o isolamento, as amostras eram estocadas por congelamento (-25°C), em caldo GC glicerinado a 20% (v/v). A identificação sorológica foi feita com antissoros OK (Difco) e algumas das amostras não EPEC foram sorogrupoadas por Fritz & Ida Ørskov, no International Escherichia and Klebsiella Centre, Copenhagen.

Testes de hemaglutinação - Foram feitos em lâmina, segundo os critérios e recomendações de Duguid (6) e Duguid & col. (7), após repiques sucessivos em caldo nutritivo a 37°C e ágar CFA (9). Em microplaca, seguimos as recomendações de Jones & Rutter (13) com cultivo em ágar CFA. Empregamos hemácias humanas (grupos A e B), bovinas, de cobaio, carneiro, galinha e coelho. Como controles, usamos as *E. coli* H10407 (pili tipo 1+, CFA/I+), H10407P (pili tipo 1+, CFA/I-) e 68 I (K88a,b+), gentilmente cedidas pelo Dr. Pestana de Castro (Unicamp).

Tabela 1 - Padrões de atividade hemaglutinante manose-sensível (HAMS), manose-resistente (HAMR) e produção de pili em amostras de *E. coli* isoladas das fezes de indivíduos saudáveis e EPEC isolados de surtos epidêmicos e casos esporádicos.

Símbolos: HAMS = Hemaglutinação manose-sensível; HAMR = Hemaglutinação manose-resistente; H=A = Hemácias humanas (gr. A); H=B = Hemácias humanas (gr. B); CB = Coelho; GA = Galinha; CO = Coelho; CN = Carneiro; BO = Bovino; +, (+), - = intensidades decrescentes da hemaglutinação; pili = microscop. eletrônica (contrast. negat.); MR = pili manose-resistente; t-1 = pili tipo 1 (ver texto); NT = Não testado; NS = Não sorotipada; (1) = *E. coli* enterotoxigênicas (ver texto); * = Amostras Controle

Microscopia eletrônica - Usamos microscópio EM-301 (Phillips) e técnica de contraste negativa, com solução a 1% (p/v) de ácido fosfotungstico (pH 7,0) com sacarose (0,1% p/v) e dimetilsulfóxido (0,01% p/v).

Aderência a células HeLa - Cultivamos as células em Eagle MEM (Gibco), suplementado com 10% (v/v) de soro de vitelo inativo (Instituto Adolfo Lutz), gentamicina (5 μ g/ml) e fungizona (2,5 μ g/ml). De cada amostra bacteriana foram feitos repiques sucessivos, em caldo e cultivo em ágar CFA, a 37°C. Dos cultivos, eram preparadas suspensões (10^8 unidades formadoras de colônias/ml) em salina tampão-fosfato Dulbecco pH 7,2 (PBS-D) e distribuídos por tubos, contendo lâminulas retangulares, com monocamadas de células HeLa, previamente lavadas para retirada do soro e antibiótico. Após 30 minutos a 37°C, com agitação suave, a cada 5 min., os tapetes celulares eram lavados por três vezes em PBS-D, fixados em metanol (Merck), imersos por 20 horas em Giemsa (Merck) 1:30 (v/v) em tampão fosfato pH 6,5, desidratados e montados em resina Caedax (Merck).

Tabela 2 - Índices de aderência para células HeLa de amostras piliadas e não-piliadas de *E. coli* EPEC e amostras não EPEC após cultivo em condições favoráveis (caldo) e desfavoráveis (ágar) à expressão das pili.

Símbolos: a = média; t = desvio padrão; Pil+ = amostras produtoras de pili tipo 1; Pil- = amostras não produtoras de pili tipo 1; Significância entre I.A. caldo/ágar: * = p < 0,05, ** = p < 0,01

Origem	Pili tipo 1	Amostras	Sorogrupo	I.A. após cultivo em	
				Caldo nutritivo	Ágar C.F.A.
Surtos epidêmicos	Pil +	386	0111:K58	6,3 ± 0,8 ^a	4,8 ± 2,1
		409	0111:K58	2,7 ± 0,7	0,2 ± 0,05**
		410	0111:K58	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2
		341	0119:K69	1,3 ± 0,9	0,1 ± 0,02*
		262	086a:K61	8,8 ± 0,3	0,09± 0,02**
	Pil -	351	086a:K61	2,7 ± 1,1	1,1 ± 0,5*
		329	0119:K69	0,6 ± 0,07	0,1 ± 0,02**
		57	086a:K61	0,2 ± 0,06	0,2 ± 0,06
		1415	055 :K59	0,4 ± 0,2	0,2 ± 0,01
		1463	0124:K72	5,6 ± 1,8	0,5 ± 0,2**
Casos esporádicos	Pil +	24	0111:K58	0,2 ± 0,7	0,07± 0,006*
		53	0111:K58	0,3 ± 0,07	0,4 ± 0,1*
		54	0111:K58	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,05
		59	0111:K58	0,1 ± 0,05	0,1 ± 0,05
		61	0111:K58	0,4 ± 0,3	0,1 ± 0,04
	Pil -	94	0111:K58	0,1 ± 0,2	0,1 ± 0,2
		68	055 :K59	0,2 ± 0,08	0,2 ± 0,02
		60	0119:K69	1,3 ± 0,5	0,09± 0,04**
		3			
		4			
Fezes "normais"	Pil +	6		1,3 ± 0,3	0,4 ± 0,2**
		7		5,9 ± 0,9	5,4 ± 1,3
		9		4,4 ± 0,7	0,1 ± 0,07**
		10		4,3 ± 0,7	0,2 ± 0,07**
		11		3,7 ± 2,0	0,3 ± 0,1**
	Pil -	2		1,2 ± 0,3	0,3 ± 0,09**
		18		5,9 ± 1,0	0,1 ± 0,03**
		18		3,7 ± 1,0	1,6 ± 1,5*
		21		1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,3
		21		2,4 ± 0,2	0,9 ± 0,9*

Índice de aderência (I.A.) - Cada teste (caldo ou ágar) foi feito em triplicata (duas lâminulas por teste), sendo as lâminas codificadas e lidas em imersão (1000x). Em cada lâminula, contavam-se 100 células ao acaso (A) e as bactérias a elas aderidas (B), calculando-se o valor da divisão B/A. O I.A. era a média dos valores B/A, obtidos em seis leituras, sendo calculado o desvio padrão. As comparações entre testes foram feitas pelo teste T (Student).

Resultados

Pili e HA - Não verificamos diferenças entre as amostras de EPEC epidêmicas e as amostras não EPEC. As EPEC esporádicas mostraram baixa frequência de HAMS. Quanto aos padrões hemaglutinantes HAMS, mesmo entre amostras de um mesmo sorogrupo ou surto epidêmico, ocorreram variações, incluindo completa ausência de hemaglutinação (Tabela 1).

Em relação à HAMR, os testes em lâmina mostraram maior ocorrência de resultados positivos entre as não EPEC. Contudo, em micropatela, verificamos HAMR exclusivamente entre as EPEC independente de origem (Tabela 1).

Todas *E. coli* HAMS+ apresentaram pili em M.E. (pili tipo 1). As amostras EPEC e não EPEC HAMR+ foram também examinadas, após cultivo em ágar CFA, sendo que apenas verificamos pili HAMR na amostra não EPEC F-30 (021:K:-H5), que deixava de produzí-lo (e de causar HAMR), após cultivo em ágar a 20°C.

Tabela 3 - Aderência para células HeLa de grupos de amostras de diferentes origens, produtoras e não-produtoras de pili tipo 1.

Símbolos: α = média dos I.A. do cultivo em caldo, das várias amostras de cada grupo \pm desvio padrão; N = Número de amostras em cada grupo; Pil⁺ = Amostras produtoras de pili tipo 1; Pil⁻ = Amostras não-produtoras de pili tipo 1; ** = diferença entre grupos significativa ao nível de $p < 0,01$; * = diferença entre grupos significativa ao nível de $p < 0,2 > 0,1$

Origem	Amostras			
	Pil +		Pil -	
	N	I.A. ^a	N	I.A.
EPEC - Epidêmicos	6	3,7 \pm 3,0	1	0,6 \pm 0,07
EPEC - Esporádicos	3	2,0 \pm 3,0	8	0,4 \pm 0,4
Não EPEC	7	3,8 \pm 1,9	3	2,6 \pm 1,0*

Aderência a HeLa - A maioria das EPEC esporádicas apresentou baixos I.A., com poucas amostras mostrando diferenças significativas entre cultivos em caldo e agar (Tabela 2). Na Tabela 3, onde consideramos a média dos I.A. de cultivos em caldo, para grupos de amostras produtoras (PIL⁺) ou não produtoras (PIL⁻) de pili tipo 1, verificamos que as EPEC epidêmicas PIL⁺ e as não EPEC PIL⁺ não diferem, significativamente, quanto a aderência, enquanto as EPEC esporádicas PIL⁺ destacam-se como grupo pouco aderente à HeLa. A mesma comparação com I.A., obtidos de cultivos em agar, não revelou diferenças significativas entre os vários grupos. Verificamos ainda que, para várias amostras PIL⁻, os repiques em caldo resultaram em I.A. significativamente maiores do que os obtidos para cultivos em agar.

Índices de aderência elevados não apresentaram correlação com padrões hemaglutinantes MS nem com o cultivo das amostras HAMR⁺ em condições favoráveis a expressão destas hemaglutininas.

Discussão

Condições de cultivo, número de repiques, densidade das suspensões bacterianas, hemácias empregadas e temperatura de realização dos testes influenciam na evidenciada aderência das hemaglutininas MS e MR de *E. coli* (7).

Nesta investigação, em que foram adotados os critérios definidos por Duguid & col. (7), notamos que a frequência de amostras produtoras de HAMS e pili tipo 1 em EPEC esporádicas, era inferior aos demais grupos. Outros (5) não verificaram diferenças na HAMS entre *E. coli* não EPEC e EPEC enquanto Evans & col. (10) descreveram padrão HAMS característico em 42% de 351 EPEC testadas. No entanto, utilizaram limitada seleção de hemácias e não estimularam pili tipo 1, por repiques sucessivos em caldo. Em nossa investigação, não detectamos qualquer padrão HAMS que distinguisse entre pili tipo 1 de amostras não EPEC e EPEC.

Quanto à HAMR, testada em lâmina, concordamos com outros (7, 10), quanto a uma maior frequência entre amostras não EPEC. Porém, o teste em microplaca foi positivo apenas entre as EPEC, sendo a pesquisa direta de pili negativa para todas as amostras HAMR⁺ (exceto F-30). Estas "hemaglutininas não-fimbriais" (12), detectadas em 12% das EPEC, estudadas por Duguid (5), constituem, ainda, 42% de todas as hemaglutininas MR, encontradas em *E. coli*, de diferentes origens e sorogrupos (7). Tais hemaglutininas não determinaram incremento ou redução na aderência para células HeLa. Contudo, "adesinas" MR não-fimbriais parecem justificar a aderência de certas estirpes de EPEC (14).

Quanto à participação de pili tipo 1 na aderência a HeLa, verificou-se a correlação entre I.A., elevados ou reduzidos, e produção ou inibição de pili tipo 1, sendo que o cultivo de amostras PIL⁺, em agar, leva, na maioria dos casos, a uma redução significativa do I.A. Por outro lado, as EPEC esporádicas, em sua maioria PIL⁻, apresentaram os mais baixos I.A.

No entanto, nota-se que algumas amostras PIL⁻, em todos os grupos, após cultivo em caldo, apresentaram I.A. significativamente maiores do que os obtidos por culti-

vo em ágar, sugerindo a interveniência de mecanismo adesivo, estimulado pelo cultivo em meio líquido e independente da produção de pili tipo 1.

A baixa frequência de pili tipo 1, entre as EPEC esporádicas e, em particular, nas amostras do sorogrupo 0111:K58, é surpreendente, tendo Duguid (5) encontrado, para este sorogrupo 90% de amostras PIL⁺. Estas amostras são de isolamento recente e foram estocadas como as demais, o que não apoia uma hipotética perda da capacidade de síntese do pili, mecanismo sugerido por Evans & col. (10), para explicar ausência de pili em EPEC, provenientes de coleção.

A participação dos pili tipo 1, na aderência para células epiteliais de mucosa e na virulência, é polêmica, dividindo-se os autores em aceitar ou negar tal participação (1, 2, 5, 6, 17).

Cravoto & col. (4), utilizando células Hep-2, verificaram maior aderência das EPEC epidêmicas, sem correlação com pili tipo 1. No entanto, a frequência de pili pode ter sido fortemente subestimada, especialmente por não terem estimulado adequadamente pili tipo 1. Duguid & col. (7) ressaltam que 1/3 de todas as *E. coli* exigem vários repiques em caldo, para expressar os pili tipo 1.

Carvalho (3), testando a aderência de EPEC a células HeLa, verificou distribuição típica, com ninhos bacterianos paranucleares, associando tal aderência a hipotéticas "fimbrias manose-resistentes". Nos nossos testes quantitativos de aderência, não percebemos qualquer padrão adesivo, peculiar para EPEC o que pode resultar das diferentes metodologias aplicadas.

Na presente investigação, verifica-se maior aderência a células HeLa, nas amostras piliadas, sem ocorrerem, contudo, diferenças quantitativas, entre a aderência de amostras não EPEC e de EPEC epidêmicas. As amostras EPEC esporádicas eram, marcadamente, destituídas de pili tipo 1 e de atividade adesiva a despeito de sua presumida enteropatogenicidade.

A aderência bacteriana é um processo específico, resultante da interação entre receptores celulares específicos e "adesinas" bacterianas (2, 8, 17). Em decorrência da complexidade desta interação, que envolve, entre outros fatores, uma adequada expressão destes receptores complementares, o modelo experimental parece-nos insatisfatório em reproduzir as condições que prevalecem "in vivo". Assim, pretendemos avaliar a aderência dos vários grupos de amostras para células epiteliais, obtidas da mucosa intestinal e oral de crianças e adultos, buscando identificar propriedades adesivas, que justifiquem a eficiência colonizadora das EPEC para os grupos etários, abaixo de dois anos.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio do Dr. Raymundo Diogo Machado (I.M.UFRJ) e dos colegas do Setor de Cultura de Células daquela instituição. À Sra. Maria Angélica Pereira da Silva, do Laboratório de Cultura de Células do SMI-UERJ, nosso reconhecimento pelo excelente trabalho técnico realizado.

Esta investigação foi financiada pela FINEP (Convênio FINEP-UERJ nº 4.3.82/0270-00 e Ac. FINEP-FUJB 4.3.83/0018.00).

Referências Bibliográficas

1. Andrade, J.R.C. - Role of fimbrial adhesiveness in guinea-pig keratoconjunctivitis by *Shigella flexneri*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11:117-125, 1980.
2. Brinton, C.C. - The pilation phase syndrome and the uses of purified pili in disease control. Proc. 23th U.S. Japan Conference on Cholera, Atlanta, p.34-60, 1977.
3. Carvalho, R.L.B. - Adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica a células HeLa. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 85p., 1981. (Tese de Mestrado).

4. Cravioto, A.; Gross, R.J.; Scotland, S.M. & Rowe, B. - An adhesive factor found in strains of *E. coli* belonging to the traditionale infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.*, 3:95-99, 1979.
5. Duguid, J.P. - Functional anatomy of *Escherichia coli* with special reference to enteropathogenic *E. coli*. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.*, 7(Supls. 13-14):1-16, 1964.
6. Duguid, J.P. - The function of bacterial fimbriae. *Arch. Immun. Ther. Exper.*, 16:173-188, 1968.
7. Duguid, J.P.; Clegg, S. & Wilson, M.I. - The fimbrial and non-fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 12:213-227, 1978..
8. Eden, S.C. & Leffler, H. - Glycosphingolipids of human urinary tract epithelial cells as possible receptors for adhering *Escherichia coli* bacteria. *Scand. J. Infect. Dis. (Suppl.)*, 24:144-147, 1980.
9. Evans, D.G. & Evans Jr., D.J. - New surface associated heat - labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. *Infect. Immun.*, 21:638-647, 1978.
10. Evans, D.J.; Evans, D.G. & DuPont, H.L. - Hemagglutination patterns of enterotoxigenic and enteropathogenic *E. coli* determined with human, bovine, chicken and guinea-pig erythrocytes in the presence and absence of mannose. *Infect. Immun.*, 23:336-346, 1979.
11. Gurwith, M.; Hinde, D.; Gross, R. & Rowe, B. - A prospective study of enteropathogenic *E. coli* in endemic diarrheal disease. *J. Infect. Dis.*, 3:292-297, 1978.
12. Ip, S.M.; Crichton, P.B.; Old, D.C. & Duguid, J.P. - Mannose-resistant and eluting haemagglutinins and fimbriae in *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, 14:223-226, 1981.
13. Jones, G.W. & Rutter, J.M. - Role of the K88 antigen in the pathogenesis of neonatal diarrhea caused by *Escherichia coli* in piglets. *Infect. Immun.*, 6:918-927, 1972.
14. MacNeish, A.S.; Turnner, P.; Fleming, J. & Evans, N. - Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet*, 2:946-948, 1975.
15. Murahovschi, J. - Contribuição ao estudo do valor dos antimicrobianos no tratamento das diarréias agudas do lactente. São Paulo, Faculdade de Medicina USP, 1969. (Tese de Doutorado).
16. Neter, E. - Enteritis due to enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediat.*, 55:223-239, 1959.
17. Ofek, I. & Sharon, N. - Comment les bactéries adhérent aux cellules. *Recherche*, 142:376-378, 1983.
18. O'Hanley, P.D. & Cantey, J.R. - Surface structures of *E. coli* that produce diarrhea by a variety of enteropathic mechanisms. *Infect. Immun.*, 21:874-878, 1978.
19. W.H.O. Scientific Working Group - *Escherichia coli* diarrhoea. *Bull. W.H.O.*, 58:23-36, 1980.

OCORRÊNCIA DE *AZOSPIRILLUM AMAZONENSE* EM ALGUNS ECOSISTEMAS DA AMAZÔNIA

Fátima Maria M. Magalhães

INPA/CNPq

Caixa Postal 478

69000 Manaus AM, Brasil

& Johanna Döbereiner

PNPBS/EMBRAPA

Km. 47 da Antiga Rio-São Paulo

23460 Seropédica RJ, Brasil

Resumo

Foi estudada a ocorrência, na região Amazônica, de *Azospirillum amazonense*, bactéria fixadora de N₂, recentemente descrita. Foram examinadas amostras de solos e de raízes de plantas, em ecossistemas naturais e em áreas cultivadas. A bactéria foi encontrada com maior frequência em gramíneas e ciperáceas, que crescem na várzea e em pastagem estabelecida com *Brachiaria humidicola*. A ocorrência de *A. amazonense*, como a de outras bactérias fixadoras de N₂, foi apenas esporádica em pastagem degradada, campina e floresta de terra firme. Contagens comparativas mostraram que *A. amazonense* ocorre em números mais altos do que as espécies conhecidas de *Azospirillum* e de *Beiherinckia*, em raízes de pupunha (*Bactris gasipaes*) e *Brachiaria humidicola*.

Summary

Occurrence of Azospirillum amazonense in some amazonian ecosystems

A survey was made of the occurrence in the Amazon region of the recently described N₂ fixing bacterium *Azospirillum amazonense*. Samples were examined from soils and plant roots collected in natural ecosystems and in cultivated areas. The bacterium was frequently found in Gramineae and some other species in low land soils (varzea) and in an established *Brachiaria humidicola* pasture. *A. amazonense* as well as other N₂ fixing bacteria were found only sporadically in degraded pasture, regenerating forest (campina) and in virgin forest (floresta de terra firme). Comparative counts with the known *Azospirillum* species and with *Beiherinckia* revieled higher numbers of *A. amazonense* in roots of a palm tree (*Bactris gasipaes*) and a grass (*Brachiaria humidicola*).

Introdução

Spirillum lipoferum originalmente descrito por Beijerinck (1), foi reclassificado após estudos detalhados com 61 estírpes, em duas espécies (11): *Azospirillum lipo-*

ferum e *A. brasiliense*. Vários trabalhos têm demonstrado a ampla distribuição dessas duas espécies, no solo e em raízes de várias espécies vegetais, em diferentes regiões (4, 7, 12, 13).

A espécie *A. amazonense*, recentemente descrita (10), foi isolada de várias gramíneas, de *Bactris gasipaes* (Palmaceae) e de outras plantas, em várias localidades da Amazônia e do Rio de Janeiro (6, 8, 9, 10). *A. amazonense* assemelha-se às espécies conhecidas do gênero, pela forma (bastonete curvo), movimento ondulatório típico e formação de película, em meio semi-sólido e diferencia-se, destas, pelo diâmetro menor (0,8m), pela intolerância a meio alcalino, pela menor tolerância ao oxigênio molecular e pela utilização de sacarose, entre outras características (9, 10). Estudos da homologia do DNA (N.R., Krieg com. pessoal), confirmam-na como nova espécie do gênero.

Neste trabalho, foi estudada a ocorrência de *A. amazonense* no solo e nas raízes de várias espécies vegetais, representativas de diferentes ecossistemas da Amazônia. Também foram realizadas contagens comparativas de *Azospirillum* spp. (*A. lipofерум* e *A. brasiliense*) e *A. amazonense*, em raízes de duas espécies cultivadas: *Bactris gasipaes* (palmacea nativa) e *Brachiaria humidicola* (Rendle) Schweickerdt.

Tabela 1 - Ocorrência de *Azospirillum amazonense* e de outros fixadores de N₂ em solo e raízes de algumas espécies de várzea.

Símbolos: a = Cultura de enriquecimento em meio sacarose semi-sólido; b = Atividade de nitrogenase (redução do acetileno); d = Espécie não identificada; e = Nome vulgar

Amostras	Nº total de culturas ^a	Culturas com ARA ^b	Culturas com <i>A. amazonense</i>	Culturas com <i>Betijerinkia</i> sp.
		%	%	%
Solo ^c	30	80	20	-
<i>Eichornia crassipes</i>	5	100	40	-
<i>Echinochao polistachya</i>	5	100	40	-
<i>Leptochloa scabra</i>	5	100	20	-
<i>Panicum boliviense</i>	5	80	20	-
<i>Paspalum repens</i>	5	100	40	-
<i>Sorghum arundineum</i>	5	80	20	-
Gramineae n.d. - bico de pato (nome vulgar)	5	80	-	20
Gramineae n.d. d - canarana roxa (n.v.) ^e	5	80	-	-
Gramineae n.d. - muri (n.v.)	5	80	40	-
Total	75	100	22	1,3

Material e Métodos

Os ecossistemas estudados, quanto à ocorrência de *Azospirillum amazonense*, podem ser assim caracterizados:

Pastagem estabelecida - Plantio de uma única espécie de graminea (no caso *Brachiaria humidicola*), após a derrubada e queima da floresta de terra firme e que recebe adubação de fósforo (o elemento mais limitante dos solos da Amazônia). A graminea se torna vigorosa e domina a paisagem.

Pastagem degradada - Após plantios sucessivos, durante muito tempo (5-10 anos) e sem cuidados conservacionistas do solo, este se torna extremamente degradado. Ocorre heterogeneidade de espécies, principalmente de gramineas invasoras, que predominam.

Campos de várzea, segundo Braga (3) - Áreas que estão sob influência de alagação, procedente de rios de águas barrentas, iluminação excessiva e biomassa mediocre, constituída por definida predominância de gramineas.

Floresta de terra firme (tipo densa) - Grande biomassa e muitas espécies por unidade de área, sem nítida predominância de uma ou de algumas delas, quanto ao número de indivíduos ou quanto à biomassa.

Tabela 5 - Análise^a de fertilidade e do pH dos solos onde foram realizados os levantamentos de ocorrência de *Azospirillum amazonense*.

Símbolos: a = Realizada pela Embrapa-Uepae, Manaus

	pH em H ₂ O	Fertilidade				
		P ppm	K ppm	me % Ca ⁺⁺	me % Mg ⁺⁺	me % Al ⁺⁺⁺
Campos de várzea	5,3	70	45	7,0	2,4	0,3
Campina	7,0	2	8	0,4	0,2	0,7
Floresta de terra firme	3,5	1	8	0,3	0,1	2,8
Pastagem estabelecida	4,0	2	28	0,3	0,5	1,0
Pastagem degradada	4,0	2	12	0,3	0,1	2,0
Pupunha (local 1)	4,8	17	73	1,0	1,4	0,8
Pupunha (local 2)	5,2	8	29	1,8	1,0	0,1
Pupunha (local 3)	5,0	261	116	1,9	1,2	0,3
Quicuio	5,0	261	116	1,9	1,2	0,3

Tabela 6 - Ocorrência numérica de *Azospirillum amazonense*, de *Azospirillum* sp. (*A. brasiliense* e *A. lipoferum*) e de *Beijerinckia* sp.

Símbolos: a = Calculados pela Tabela do Número Mais Provável (NMP) de McCrady; b = Em *Bactris gasipaes* a contagem nas amostras foi feita pelo método das diluições sucessivas; c = Em meio NFb semi-sólido sem N combinado; d = Em meio sacarose semi-sólido sem N combinado; * = Esterilizada superficialmente

Amostra	<i>Nº bactérias x 10⁻²/g peso fresco de raiz</i>		
	<i>Azospirillum</i> sp ^c	<i>Azospirillum</i> <i>amazonense</i> ^d	<i>Beijerinckia</i> sp ^d
Pupunha ^b (local 1)			
Raiz não lavada	45 ^a	1400	4,5
Raiz lavada	2,5	0,9	0,3
Raiz ester. superf.*	2,5	2,5	0
Pupunha (local 2)			
Raiz não lavada	9,5	7,5	7,5
Raiz lavada	2,5	25	0,7
Raiz ester. superf.*	4,5	110	0,4
Pupunha (local 3)			
Raiz não lavada	1400	1400	0
Raiz lavada	2,5	1100	0
Raiz ester. superf.*	150	40	0
<i>Brachiaria humidicola</i>			
Raiz não lavada	25	1400	0
Raiz lavada	115	1400	0
Raiz ester. superf.*	45	140	0

Análises da fertilidade e do pH (H₂O) dos solos, de todos as áreas estudadas, foram realizadas pela Embrapa-Uepae, de Manaus.

O material botânico foi identificado pelo Departamento de Botânica do INPA.

Resultados e Discussão

As Tabelas 1, 2, 3 e 4 mostram a ocorrência de *A. amazonense* e de outras fixadoras de N₂ no solo e em raízes (não lavadas), de espécies representativas de cinco diferentes ecossistemas da Amazônia brasileira.

A presença de *A. amazonense*, nas culturas de enriquecimento, que apresentaram película e atividade da nitrogenase, foi confirmada por observação ao microscópio e também isolamento posterior, uma vez que, neste mesmo meio, foi verificado, ocasionalmente, crescimento de *Beijerinckia* sp. (com formação de película difusa) e de outras espécies fixadoras de N₂ (redutoras de acetileno) não identificadas. Este procedimento possibilitou verificar que a simples observação, ao microscópio, de culturas com película e atividade da nitrogenase, em meio sacarose semi-sólido, é suficiente para confirmar a presença de *A. amazonense*, pois sua forma é perfeitamente distingível das outras fixadoras de N₂ que crescem neste meio.

A maior porcentagem de culturas de enriquecimento com ARA ocorreu na várzea (86%), seguida de pastagem estabelecida (69%), floresta (24%), pastagem degradada (21%) e, por último, campina (3%).

Nem todas as culturas de enriquecimento com ARA continham *A. amazonense*. Sua presença só foi detectada em 22% das culturas de várzea, 33% das culturas de pastagem estabelecida e 5,7% das culturas de pastagem degradada, sendo esses números referentes à porcentagem, em relação ao número total de culturas. Em campina e floresta, não foi detectada a presença de *A. amazonense* nas amostras coletadas, embora tivesse sido isolada, anteriormente, uma estirpe, de raízes de uma gramineia invasora, em caminho aberto na floresta. O maior número de culturas de enriquecimento, com ARA na floresta, foi de culturas de solo. Em cinco destas, foi identificada a

presença de *Beijerinckia* sp. As únicas culturas de raízes, que apresentaram ARA, eram de duas leguminosas coletadas e nestas, não houve identificação da espécie responsável pela fixação de N₂.

Em várzea, pastagem estabelecida e pastagem degradada, *A. amazonense* ocorreu no solo e nas raízes de quase todas as espécies de gramíneas coletadas e ainda em *Bicornis crassipes* e *Rynchospora cephalotes* (Cyperaceae). Também foi identificada a presença de *Beijerinckia* sp. em uma amostra de raiz da várzea. Nas amostras com atividade da nitrogenase (ARA) em que, ou *A. amazonense* ou *Beijerinckia* sp. não foram detectadas, não foi possível determinar a espécie fixadora de N₂ responsável por tal atividade.

A maior ocorrência de *A. amazonense*, em solos de pastagem estabelecida e de várzea, pode estar relacionada com a maior fertilidade destes solos (Tabela 5). A abundância desta espécie e de outros microrganismos fixadores de N₂, em solos de várzea, pode estar sendo favorecida pelas condições microaerófilicas do ambiente, como sugerido por Buresh & col. (2). Os dados também sugerem que gramíneas favorecem a ocorrência de *A. amazonense* e é de se ressaltar sua ocorrência em solos extremamente ácidos, como os de pastagem, com pH 4,0 (Tabela 5).

A Tabela 6 mostra a ocorrência numérica de *Azospirillum* spp. e *Beijerinckia* sp., em raízes de *Bactris gasipaes* e *Brachiaria humidicola*. Em todas as amostras pesquisadas, as três espécies de *Azospirillum* foram detectadas, inclusive em amostras de raízes esterilizadas superficialmente, indicando infecção de tecidos internos da raiz por essas espécies fixadoras de N₂.

Os números de *A. amazonense*, encontrados em raízes esterilizadas superficialmente, variaram de $2,5 \times 10^2$ a $1,4 \times 10^4$ células/g peso fresco. Variação numérica semelhante ocorreu com *Azospirillum* spp. Em raízes não lavadas, as espécies de *Azospirillum*, inclusive *A. amazonense*, foram encontradas em números de até $1,4 \times 10^5$ células/g peso fresco, parecendo o último ocorrer em maior número.

Os resultados deste trabalho mostram que *Azospirillum amazonense* parece ocupar vários habitats da Amazônia, ocorrendo no solo e na ecto- e endorizosfera de várias espécies vegetais. Foi encontrado especialmente em Gramineae, em campos de várzea, pastagem degradada e pastagem estabelecida de *Brachiaria humidicola*, e pode ocorrer juntamente com as duas outras espécies (*A. brasiliense* e *A. lipoferum*). Foi também encontrada no interior de raízes de *Brachiaria humidicola* e *Bactris gasipaes*.

Referências Bibliográficas

1. Beijerinck, M.W. - Über ein *Spirillum*, welches freien Stickstoff binden kann. Zent. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. II, 63:353-359, 1925.
2. Buresh, R.J.; Casselman, M.E. & Patrick Jr., W.H. - Nitrogen fixation in flooded soil systems: a review. Adv. Agron., 33:149-192, 1980.
3. Braga, P.I.S. - Sub-divisão fitogeográfica, tipo de vegetação, conservação e inventário florístico da floresta Amazônica. In: - Estratégias para política florestal na Amazônia Brasileira. Acta Amazonica (suplemento), 9:53-80, 1979.
4. Dobereiner, J.; Marrieli, I.E. & Nery, M. - Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beiherinck. Can. J. Microbiol., 22:1464-1473, 1976.
5. Dobereiner, J. - Forage grasses and grain crops. In: - Bergersen, F.J., ed. - Methods for evaluating biological nitrogen-fixation. New York, John Wiley & Sons, p.535-555, 1980.
6. Dobereiner, J.; Magalhães, F.M.M. & Baldani, J.I. - A new root associated diazotroph bacterium *Azospirillum amazonense* sp. nov. In: - Veeger, C. & Newton, W.E., eds. - Advances in nitrogen fixation research. Holland, p.49, 1984.
7. Lakshmi-Kumari, M.; Kavimandan, S.K. & Subba-Rao, N.S. - Occurrence of nitrogen fixing *Spirillum* in roots of rice, sorghum, maize and other plants. Ind. J. Exp. Biol., 14:638-639, 1979.
8. Magalhães, F.M.M. - Nitrogen-fixing bacteria isolated from diverse soils and grass roots in Amazonia. In: - Vose, P.B. & Ruschel, A.P., eds. - Associative N₂ fixation. USA, CRC Press, vol.2, p.37-46, 1981.

9. Magalhães, F.M.M. - Caracterização e distribuição de uma nova espécie de bactéria fixadora de nitrogênio. Manaus, INPA/Universidade do Amazonas, 89p., 1983. (Tese de Mestrado).
10. Magalhães, F.M.M.; Baldani, J.I.; Souto, S.M.; Kuykendall, J.R. & Dobereiner, J. - A new acid-tolerant *Azospirillum* species. An. Acad. Brasileira Ci., 55:417-430, 1983.
11. Tarrand, J.J.; Krieg, N.R. & Dobereiner, J. - A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with description of a new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 24:967-980, 1978.
12. Vlassak, K. & Reynders, L. - Associative dinitrogen fixation in temperate regions. In: - Isotopes in biological dinitrogen fixation. Ed. Viena, International Atomic Energy Agency, p.71-87, 1978.
13. Watanabe, I.; Barraquio, W.L.; Gusman, M.R. & Cabrera, B.A. - Nitrogen-fixing (acetylene reduction) activity and population of aerobic heterotrophic nitrogen-fixing bacteria associated with wetland rice. Appl. Environ. Microbiol., 37:813-819, 1979.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS PRUEBAS BIOQUÍMICAS EMPLEADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EN ALIMENTOS*

Raúl Castro

Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria
Universidad Austral de Chile
Casilla 567
Valdivia, Chile (S.A.)

Resumen

El análisis rutinario de *Staphylococcus aureus* en alimentos, se basa en la determinación de algunas enzimas típicas de la especie, pero usualmente se emplea sólo la prueba de la coagulasa para diferenciar entre *Staphylococcus aureus* y *Staphylococci* no patógenos. Para conocer la validez de estos procedimientos, se estudiaron las características de coagulasa, lecitinasa, deoxirribonucleasa (DNasa) y deoxirribonucleasa termoestable (TNasa) en cepas aisladas de muestras clínicas y de alimentos. De las pruebas mencionadas, la coagulasa fue la de menor repetibilidad y la lecitinasa mostró la mayor variación con respecto a las demás. Todas las cepas fueron DNasa y TNasa positivas.

Summary

Comparative study of the biochemical test used to determine Staphylococcus aureus in foods

The detection of *Staphylococcus aureus* in food is based on the determination of some enzymes typical for the specie. In the routine analysis the coagulase test is used to difference *Staphylococcus aureus* from non patogenical *Staphylococci*. From the tests mentioned before, coagulase had the worst repetibility and lecithinase showed more variation with respect to the others. All the strains were both DNase and TNase positives. In order to compare the different procedures availables for the detection of *S. aureus*, strains isolated from clinical samples and food were tested for coagulase. To know the efficacy of these procedures, the coagulase, lecithinase, deoxiribonuclease (DNase) and thermostable deoxiribonuclease (TNase) characteristics of strains isolated from infections and foods were studied.

Introducción

Una de las bacterias patógenas que más frecuentemente ocasiona problemas de intoxicaciones alimentarias es el *Staphylococcus aureus*, que se encuentra en alrededor de un 40% de los casos reportados (1).

* Trabajo financiado parcialmente por la Dirección de Investigación y Desarrollo de la Universidad Austral de Chile - Proyecto S-83-55.

Sin embargo, la tasa real es mayor ya que por su sintomatología inespecífica la estafilococosis puede ser confundida con otras causales y tratada sin acudir a un médico, por lo que el número verdadero de casos no queda registrado (1).

El cuadro es producido por una serie de toxinas de naturaleza proteica y acción enética (A, B, C₁, C₂, D, E), ampliamente descritas y estudiadas (1, 2).

Su principal acción es enética por una actividad irritante de la pared del estómago y tracto intestinal, produciendo además diarreas y dolores abdominales (5).

La determinación de estas toxinas en los alimentos se realiza mediante análisis biológicos en animales de experimentación y diversos tests inmunológicos (de difusión en agar, ELISA, precipitación, inmunolectroforesis, etc.) (4).

Como éstas son, en general, pruebas costosas y relativamente complejas para ser empleadas en forma rutinaria, se prefiere determinar ciertas enzimas que tienen la propiedad de presentar una alta correlación con la presencia de las bacterias que se están determinando.

Diversos autores han demostrado la confiabilidad de esta relación y por razones de costo y tiempo se prefiere emplear los tests bioquímicos en análisis rutinarios, aún cuando un resultado certero lo daría únicamente la determinación de las toxinas por alguno de los métodos citados (1, 6, 7, 8).

Las pruebas bioquímicas más empleadas son la coagulasa, lecitinasa, DNasa y TNasa.

La coagulasa es la más comúnmente empleada y presenta algunas variaciones de acuerdo a las diversas técnicas, de manera que se recomienda emplear plasma de conejo con EDTA para obtener resultados más repetitivos (1, 8).

La lecitinasa corresponde a una prueba de tipo general que se realiza en agar con yema de huevo como análisis primario para seleccionar las bacterias que se analizarán posteriormente en los otros tests y presenta algún valor para relacionarlo con su capacidad enterotoxigenica (1, 3, 8).

La deoxirribonucleasa (DNasa) y deoxirribonucleasa termoestable (TNasa) son las más específicas para establecer una correlación con la toxicidad. La segunda de ellas es más específica y puede ser empleada con mayor propiedad para la determinación de la patogenicidad de una cepa (1, 3).

En este trabajo se estudiaron las características bioquímicas de cepas de *Staphylococcus aureus* clasificadas como tales por el test de la coagulasa.

La prueba de referencia será la TNasa por ser considerada la de mayor correlación con la toxicidad (1, 4, 6, 11).

Además se determinaron las enzimas lecitinasa y DNasa.

Las cepas fueron obtenidas de alimentos y muestras clínicas, representando estas últimas el riesgo de contaminación por manipuladores de alimentos.

Material y Metodos

Cepas de S. aureus - Se emplearon 48 cepas, de las cuales 27 provenían de muestras clínicas y 21 de alimentos.

Todas las cepas fueron clasificadas originalmente como coagulasa positivas, empleando plasma humano citratado, en los laboratorios de diagnóstico donde se obtuvieron.

Técnicas de laboratorio - Coagulasa - Se hizo de acuerdo al procedimiento descrito por la FDA (8), que consiste en inocular la colonia aislada a caldo cerebro corazón, incubar 18 hrs. a 35°C, inocular 0,5ml de plasma de conejo con 0,2ml del cultivo anterior y leer dentro de 6 hrs.

Lecitinasa - Se realizó según el procedimiento de la ICMSF (9) que consiste en observar el halo que se forma alrededor de la colonia al crecer en un medio con lecitina (yema de huevo).

DNasa - Se realizó de acuerdo a la técnica de que consiste en sembrar la cepa en agar-DNA, incubar y luego observar la degradación del DNA alrededor de la colonia, agregando HCl 1N para solubilizar las bases nucleotídicas libres en el agar (10).

Tabla 1 - Número de cepas de *Staphylococcus aureus* positivas a las pruebas de coagulasa, lecitinasa, DNasa y TNasa

	Coagulasa	Lecitinasa	DNasa	TNasa
Nº cepas	46	36	48	48

Tabla 2 - Distribución de las cepas positivas a las pruebas de Coagulasa, lecitinasa, DNasa y TNasa

Nº cepas	Coagulasa	Lecitinasa	DNasa	TNasa
35	+	+	+	+
11	+	-	+	+
1	-	+	+	+
1	-	-	+	+

TNasa - Se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento de Lachica (11). La cepa incubada en caldo cerebro corazón se llevó a baño maría hirviente por 15', se colocó en pocillos formados en agar con azul de o-toluidina y se observó, en los casos positivos, la reacción metacromática del colorante con los nucleóticos, virando a un color rosado.

Procedimiento del análisis - Cada cepa se sembró en agar Baird Parker con yema de huevo para comprobar su pureza (9) y se le realizó un gram para confirmar que se trataba efectivamente de *Staphylococcus* (5).

La característica lecitinasa positiva se presenta como un halo claro junto a las colonias y uno de precipitación un poco más retirado de ellas debido a que al degradarse la lecitina se producen cambios en la estabilidad de la emulsión, precipitando las proteínas que se mantenían hasta ese momento en suspensión (3).

De esa placa se inoculó un tubo con caldo cerebro corazón y se llevó a incubación por 18 hrs. a 35°C; del tubo se sacó el inóculo para las pruebas de coagulasa, DNasa y TNasa (8).

Con el método empleado corrientemente en los laboratorios de análisis microbiológico de alimentos, normalmente se llega hasta la prueba de la coagulasa y no se realiza el gram.

Una vez analizadas todas las cepas, se repitió el procedimiento otras dos veces. En los casos en que hubo discordancia con algún resultado, se analizó nuevamente hasta obtener un resultado repetitivo.

Resultados

En la Tabla 1 se presenta la cantidad de cepas, de un total de 48, que fueron positivas a las pruebas bioquímicas estudiadas.

Todas las cepas fueron DNasa y TNasa positivas indicando con alta probabilidad que se trata de cepas enterotoxigenicas. Dos de ellas resultaron coagulasa negativas y doce lecitinasa negativas siendo ésta la prueba que presentó menor relación con las demás.

La prueba de coagulasa presenta alta variabilidad por lo que se debió realizar el análisis más de tres veces para obtener un resultado confiable. Sin embargo, su correlación con la DNasa y TNasa fue alta, ya que hubo discordancia en solamente dos casos.

En la Tabla 2 se presenta la distribución de las cepas positivas a coagulasa, lecitinasa, DNasa y TNasa. La mayoría de las cepas fue positiva a las cuatro pruebas, pero es interesante destacar que un número considerable fue negativo a la prueba primaria de la lecitinasa y que, las colonias coagulasa negativas fueron positivas a las pruebas de la DNasa y TNasa.

Discusion

La prueba de DNasa fue positiva en todos los casos, lo cual concuerda con el hecho que también fueron TNasa positivos y por lo tanto presentan una deoxirribonucleasa termoestable, la que se detecta con ambas pruebas.

En dos cepas la prueba de la coagulasa fue negativa para la técnica empleada; pero originalmente fueron positivas con plasma humano citratado y con plasma con EDTA. Esto corrobora las observaciones que indican que el resultado depende del tipo de plasma que se emplea (3). También influye el tipo de anticoagulante cuando se trata de variedades citrato positivas ya que en ese caso se produce la coagulación del plasma por utilización del anticoagulante (3). En las cepas indicadas, la variación en los resultados sólo se debió al tipo de plasma ya que fueron citrato negativas.

Es conveniente destacar que la prueba de la coagulasa fue bastante variable; muchas cepas fueron negativas en una primera determinación, pero posteriormente resultaron ser positivas ya que se trata de una enzima inducible por sustrato (3). Es importante considerar este hecho, ya que muchas cepas estarían siendo clasificadas como no patógenas de acuerdo a muchas legislaciones sanitarias, y entre ellas la chilena (12), en las que solamente se considera la prueba de la coagulasa para su diagnóstico.

En cuanto a la prueba de la lecitinasa, la alta proporción de cepas negativas indica su baja relación con la prueba de la TNasa y por lo tanto, la escasa validez de esta prueba como índice de patogenicidad.

El procedimiento rutinario de análisis de *S. aureus* en alimentos contempla un aislamiento en agar Baird-Parker con yema de huevo y en seguida una siembra en caldo cerebro corazón para de allí realizar la prueba de coagulasa con las cepas lecitinasa positivas, o de diferente tipo, dependiendo del criterio empleado en cada laboratorio, pero bastando este resultado para ser clasificadas como patógenas.

Como conclusión de este trabajo se puede señalar la inconveniencia de emplear la prueba de la lecitinasa en diagnóstico de *S. aureus*, ya que su correlación con las otras pruebas es muy baja. Aunque con mayor correlación, la prueba de la coagulasa tampoco es absolutamente confiable como se la ha considerado hasta el momento. En cambio, ante la eventual imposibilidad de realizar la prueba de la TNasa, la DNasa parece ser una alternativa confiable, aunque de acuerdo a la información bibliográfica con una muestra mayor esta correlación probablemente no hubiera sido total.

Considerando estos hechos, se pueden sugerir algunas modificaciones en la técnica rutinaria comúnmente empleada. Estas son:

1 - El aislamiento en placa puede hacerse en un medio selectivo, sin necesidad de incluir la yema de huevo, ya que la lecitinasa no es una prueba adecuada para la selección.

2 - Como alternativa ante la prueba de la coagulasa, es equivalente en tiempo y costo la prueba de la TNasa, siendo además un índice más representativo de la patogenicidad.

3 - En forma paralela se puede hacer un gram para comprobar que efectivamente se trata de un *Staphylococcus*.

Siguiendo este procedimiento se deberían obtener resultados más confiables con un costo y empleo de tiempo equivalente.

Agradecimientos

Agradezco la colaboración prestada por la Srta. T.M. Vijna Illesca del Hospital Regional de Temuco y las Sras. T.M. Nieves Morales y Edith Hernández del Hospital Regional de Valdivia.

Agradezco asimismo las valiosas sugerencias dadas por la Dra. Erika Gesche y la Sra. T.M. Renate Schoebitz, durante el transcurso del trabajo y redacción del artículo.

Referencias Bibliográficas

1. Bergdoll, M.S. - Staphylococcal intoxications. In: - Riemann, H. & Bryan, F.F., eds. - Food-borne infections and intoxications. 2.ed. London, Academic Press, p.444-494, 1979.
2. Bergdoll, M.S.; Huang, I.Y. & Schantz, E.J. - Chemistry of the staphylococcal enterotoxins. J. Agr. Food Chemistry, 22:9-13, 1974.
3. Blazevic, D.J. & Ederer, G.M. - Principles of biochemical tests in diagnostic microbiology. New York, John Wiley & Sons, p.19-72, 1974.
4. Blobel, H. & Schiesser, T. - Handbuch der bakteriellen infektionen bei Tieren. Band II, Jena, Gustav Fischer Verlag, 1980.
5. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, p.484-487, 1979.
6. Chesbro, W.R. & Auborn, K. - Enzymatic detection of the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. Appl. Microbiol., 15:1150-1159, 1967.
7. Cords, B.R. & Tatini, S.R. - Applicability of heat-stable deoxyribonuclease assay for assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. J. Dairy Sci., 56:1512-1519, 1973.
8. Food and Drug Administration - *Staphylococcus aureus*. In: - Bacteriological analytical manual. 5.ed. Arlington, A.O.A.C., p.1-7, 1979.
9. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) - Microorganisms in foods. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, p.222-223, 1978.
10. Jeffries, C.D.; Holtman, D.F. & Guse, D.G. - Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. J. Bact., 73:590-591, 1957.
11. Lachica, R.V.F.; Hoeprich, P.D. & Frantr, C.E. - Convenient assay for staphylococcal nuclease by the metachromatic well-agar diffusion technique. Appl. Microbiol., 24:920-923, 1972.
12. Ministerio de Salud, República de Chile - Reglamento sanitario de los alimentos. Decreto nº 60 del 5/4/82.
13. Petras, P. - Detection of Staphylococcal enterotoxigenicity. I - Methods. J. Hygiene, Epidemiology and Immunol., 24:22-28, 1980.

AIRBORNE FUNGI OF BAIXADA SANTISTA, STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Adhemar Purchio
Walderez Gambale
Claudete Rodrigues Paula

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

Celso Ugolini
& Clarice A. Remie

Faculdade de Ciências Médicas de Santos
Rua Dr. Armando de Salles Oliveira, 150
11100 Santos SP, Brasil

Summary

Frequency of anemophilous fungi was measured from August, 1975 to July, 1976 in distinct areas of the Baixada Santista, State of São Paulo, Brazil, taking into account several geographic parameters, especially those related to environmental pollution. Through 258 exposures of Petri dishes containing Sabouraud agar medium in five different locations, 2221 fungi (molds) colonies, were identified, including 35 genera and 221 fungi colonies that did not sporulate (NSF). Most frequent genera were *Penicillium* (51,2%), *Cladosporium* (48,8%), *Aspergillus* (23,7%), *Epicoccum* (23,6%), *Aureobasidium* (15,5%) and *Neurospora* (11,6%). The NSF (32,9%) as well as the genera specified above were isolated in all locations with the predominance of *Cladosporium* in the cold months, and *Penicillium* in the warm months. The less polluted region revealed a smaller number of genera, a lower relative frequency and fewer NSF colonies. Adjacent regions, similar both in their demographic and physiographic structural components, presented very similar fungal rates. The commercial area presented increased rates concerning genera of fungi, number of colonies and relative frequency of NSF. In the industrial park area, the number of sporulated fungi genera was smaller, but the number of total colonies as well as the rate of NSF frequency, were the highest. These results from the most polluted region were statistically significant and indicate that chemical pollutants inhibit the sporulating mechanisms and that the fungi, multiply themselves in a vegetative manner. Depending upon the standardization of the sampling techniques, culture media and the global analysis of the results of similar works developed in other areas, the relative frequency of the NSF can be used as a microbiological indicator of atmospheric pollution.

Resumo

Fungos anemófilos da Baixada Santista, Estado de São Paulo, Brasil

Frequência de fungos anemófilos foi avaliada, de agosto de 1975 a julho de 1976, em áreas distintas da Baixada Santista (Estado de São Paulo, Brasil), levando-se em consideração vários parâmetros geográficos, especialmente os relacionados com poluição ambiental. Através de 258 exposições de placas de Petri com ágar Sabouraud, em cinco locais, foram isoladas 2.221 colônias de bolores, pertencentes a 35 gêneros e 221 colônias de fungos não esporulados. Os gêneros mais frequentes foram: *Penicillium* (51,2%), *Cladosporium* (48,8%), *Aspergillus* (23,7%), *Epicoccum* (26,6%), *Aureobasidium* (15,5%) e *Neurospora* (11,6%). Os fungos não esporulados (32,9%), assim como os gêneros mencionados acima, foram isolados em todos os locais, com predominância de *Cladosporium* nos meses frios, e de *Penicillium*, nos meses quentes. A região menos poluída (Ponta da Praia), da área estudada, apresentou menor número de gêneros, menores frequências relativas de cada gênero, assim como menor número de colônias de fungos não esporulados. As regiões adjacentes (Marapé e Vila Valença), que apresentam componentes estruturais demográficos e fisiográficos similares, também apresentaram valores semelhantes aos da Ponta da Praia. O centro comercial da região (Gonzaga) apresentou valores aumentados no número de gêneros dos fungos e no número de colônias e frequência relativa dos não esporulados. No polo industrial de Cubatão, o número total de gêneros de fungos esporulados foi menor, mas o número total de colônias, assim como a frequência relativa dos fungos não esporulados, foram os mais altos dentre todos. Os resultados indicam que os poluentes químicos devem inibir os mecanismos de esporulação dos fungos, e estes passam a se multiplicar através de reprodução vegetativa (fragmentação de hifas). Dependendo da padronização de técnicas de coleta, meios de cultura e de análises globais de trabalhos semelhantes, a serem desenvolvidos em outras áreas, a frequência relativa de fungos não esporulados poderá ser utilizada como indicador microbiológico de poluição atmosférica.

Introduction

The study of anemophilous fungi has taken on greater interest since Blackley (4) suggested their role in certain allergic manifestations of the upper region of the respiratory system. Numerous studies on allergenic fungi activity (1, 7, 8, 10, 12) as well as on their different frequencies from season to season and at different latitudes of the earth (2, 5, 9, 11) have been undertaken. Relationships between such microorganisms and pollution factors were suggested by Simard's (14), who foresaw using the yeasts from river water, as possible pollution indicators, in a way similar to the use of coliform bacteria.

The techniques proposed in the 14th edition of the "Standard Methods for the Examination of Water and Waste-Water" (3) suggest that in non-polluted rivers the number of true aquatic fungi is greater than that of soil fungi. As water pollution increases, the amount of true aquatic fungi decreases and soil fungi yeasts included, increase. So, the study of anemophilous fungi in polluted areas add new knowledge to the evaluation of their potentialities as microbiological indicator of

environmental pollution. The Baixada Santista, State of São Paulo, Brazil, presents locations with distinct polluted and non polluted areas, being suitable for this kind of study.

Material and Methods

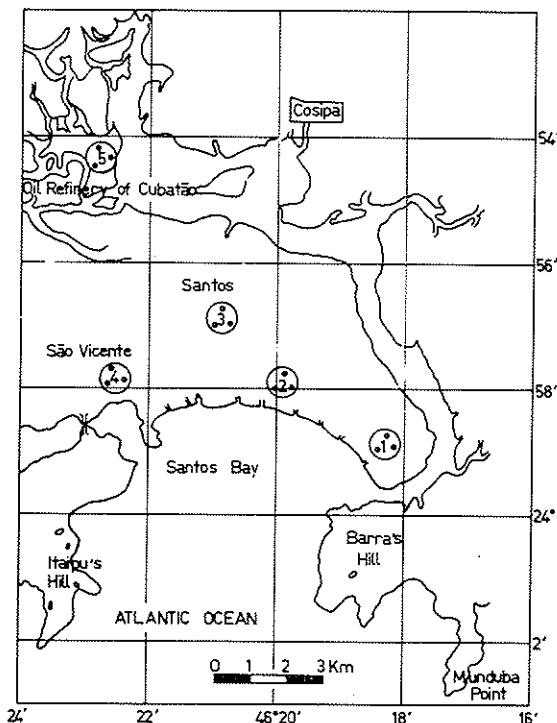
The Baixada Santista is a region below the Tropic of Capricorn, which link the so-called northern litoral, that correspond to the slopes of the Planalto Paulista (Paulista Plateau) and the southern litoral, which begins at the village of Itanhaém. It constitutes the atlantic shoreline of the state of São Paulo, which includes, the gulf of Santos, the islands of São Vicente and Santo Amaro, practically linked to the continent. In this important region, can be found two main cities, Santos and São Vicente and several small cities, and a population of more than 1 million inhabitants. Its tropical climate is very moist (the AF type in Koppen classification), with significant thermal variations. Besides a good aeration, the region presents an annual average temperature of 21.9°C, with maximum average of 41.8°C and minimum of 5°C. The average annual rainfall is very high, near or over 2,000mm, never less than 60mm.

The average solar light incidence (insolation) is 151.4h - 155.6h in the summer months, 164.3h in the autumn and winter and 121.7h in the spring months. The high relative humidity rate during the year around is noteworthy. Average humidity readings over a recent one-year period were: 81% in winter; 80% in autumn; 71% in spring and 75% in summer. The region is under the influence of low atmospheric pressure from November to March and high atmospheric pressure from April to October. The prevailing winds are those from the South (S) (11.6%), East (E) (7.0%), East South East (ESE) (6.4%), South South West (SSW) (5.8%), South South East (SSE) (4.7%), those from the Northern (N) quadrant appearing with quite lower frequency. Calm or stagnant conditions predominate 51.8% of the time. Winds from the NE may occur in January. When S and SE humidity carrying winds reach the Cubatão Mountain Range (Serra do Mar), they are forced through it according to an adiabatic gradient (dry or moist). Reaching the saturation point, a fog is formed which may be very light or extremely dense. The regional relief is one of contrasting characteristics, with somewhat distinct areas, owing to certain climatic or geographic factors (13). At one side stands the Cubatão Mountain Range while on the other side, along the coast line there exists a very diversified profile. Additional topographic features to be

Figure 1 - Sampling stations of airborne fungi in the Baixada Santista (São Paulo State, Brazil).

Symbols: 1 = Ponta da Praia (residential zone); 2 = Gonzaga (residential and commercial zone); 3 = Marapé (residential zone); 4 = Vila Valença (residential zone); 5 = Cubatão (industrial, commercial and residential zone)

-Sampling stations of airborne fungi in the Baixada Santista
(São Paulo State - Brazil)



considered are those of an edaphic and vegetable nature as well as those originating, from man's activity in the region, such as altered landscapes resulting from sanitation projects, new road construction and industrial plant development, e.g. the oil refinery and the ironworks in Cubatão. Generally speaking, coastal region climate is significantly affected by the sea winds, aside from urbanization factors. Other factors which should also be taken into consideration, are the presence of sodium chloride and iodine in the atmosphere.

Five stations were chosen according to demographic density, zone (industrial, commercial or residential) and geographic position. Three different collection sites were determined at each station (Fig. 1).

At each collection site, Petri dishes (10cm in diameter) containing Sabouraud-agar medium were horizontally positioned at an elevation of 1.2m for a 15-minutes air exposure period in order for fungal spore sedimentation to occur. This sampling procedure was repeated weekly from August, 1975 to July, 1976, thus obtaining a total of 258 exposures.

At each collection site, Petri dishes (10cm in diameter) containing Sabouraud-agar medium were horizontally positioned at an elevation of 1.2m for a 15-minutes air exposure period in order for fungal spore sedimentation to occur. This sampling procedure was repeated weekly from August, 1975 to July, 1976, thus obtaining a total of 258 exposures.

Plates were incubated at 25°C for identification after a one week period of growth. Fungi not presenting sporulating structures in Sabouraud agar medium were sub-cultured in potato-agar, corn meal agar of Czapecz agar. Persisting in the non-sporulated state, the cultures were recorded as Non Sporulating Fungi (NSF).

The χ^2 distribution method was employed in the analysis of the qualitative differences of NSF frequency among the different collecting stations.

Results

From 258 Petri dishes exposures, 2221 fungal colonies were obtained and identified (Table 1). Among 1992 colonies, 35 genera of sporulating fungi were identified, nine of them showing a relative frequency above 10%, as follows: *Penicillium* (51.2%), *Cladosporium* (48.8%), *Aspergillus* (23.7%), *Epicoccum* (23.6%), *Fusarium* (17.4%), *Aureobasidium* (15.5%), *Neurospora* (11.6%), *Curvularia* (10.5%) and *Rhizopus* (10.1%). The remaining 229 (32.9%) colonies did not reveal sporulating structures in the culture used.

Table 2 includes the groups of fungi presenting frequencies above 10%. Exceptions were made for *Fusarium* which was not isolated in June and July, *Curvularia* not isolated from November to May and *Rhizopus* absent in November. All others were isolated all year round, including NSF. *Penicillium* was predominant in December, January, March, through June; *Cladosporium* in August, October, February and July, and NSF in September. In November, the latter three genera recorded the same highest frequency (50%). It may be interesting to note that *Phoma* and *Alternaria*, which do not have a frequency of 10% or more, were nevertheless isolated in nearly all months except for *Phoma* in May and *Alternaria* in December and June.

Table 1 - Frequency and number of colonies of airborne fungi isolated in Baixada Santista (August 1975/July 1976).

Symbols: * = Based on 258 exposures; ** = 2,221 isolated colonies; *** NSF = (Non Sporulating Fungi); F = Absolute frequency; % = Relative frequency

Genus	F	%*	Number of colonies**
<i>Penicillium</i>	132	51.2	457
<i>Cladosporium</i>	126	48.8	435
<i>Aspergillus</i>	61	23.7	160
<i>Epicoccum</i>	61	23.6	160
<i>Fusarium</i>	45	17.4	95
<i>Aureobasidium</i>	40	15.5	90
<i>Neurospora</i>	30	11.6	88
<i>Curvularia</i>	27	10.5	50
<i>Rhizopus</i>	26	10.1	66
<i>Phoma</i>	22	8.5	42
<i>Alternaria</i>	18	7.0	56
<i>Pestalotia</i>	16	6.2	36
<i>Helminthosporium</i>	16	6.2	25
<i>Cephalosporium</i>	15	5.8	42
<i>Hemicola</i>	11	4.3	24
<i>Trichodermus</i>	9	3.5	12
<i>Nigrospora</i>	9	3.5	13
<i>Scopulariopsis</i>	9	3.5	19
<i>Gastridium</i>	6	2.3	13
<i>Chaetomium</i>	5	1.9	11
<i>Stenophytum</i>	5	1.9	13
<i>Paeciliomyces</i>	5	1.9	10
<i>Trichotrichum</i>	4	1.6	5
<i>Scropydomyces</i>	4	1.6	13
<i>Anthrenium</i>	3	1.2	13
<i>Mucor</i>	3	1.2	4
<i>Hemispora</i>	3	1.2	7
<i>Verticillium</i>	2	0.8	21
<i>Gliocladium</i>	2	0.8	2
<i>Botrytis</i>	1	0.4	1
<i>Graphium</i>	1	0.4	5
<i>Microsporum</i>	1	0.4	1
<i>Sachybotrys</i>	1	0.4	1
<i>Pleospora</i>	1	0.4	1
<i>Circinella</i>	1	0.4	1
NSF***	85	32.9	229

The following genera were isolated in all stations (Table 3): *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Neurospora*, *Curvularia*, *Rhizopus*, *Phoma*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Cephalosporium* and NSF. The genera *Hunicola* and *Scopulariopsis* were isolated at all sites except Cubatão.

For the 35 genera isolated, 17, as well the NSF occurred in all seasons (Table 4); 26 genera were isolated in spring and autumn, 27 in winter and 22 in summer. The most frequent in spring and winter was *Cladosporium*, and in summer and autumn, *Penicillium*. By seasons and individually, the greater fungi frequencies were: spring - *Fusarium*, *Aureobasidium*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Cephalosporium*, *Nigrospora* and NSF; summer - *Rhizopus*, *Pestalotia*, *Helminthosporium*; autumn - *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Scopulariopsis*, *Chaetomium*, *Stemphylillum* and *Graphium*; winter - *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Neurospora*, *Phoma*, *Geotrichum*, *Paecilomyces*, *Trichotecium*, *Mucor*, *Botrytis*, *Stachybotrys*, *Pleospora*, *Circinella*. It can be found from the data in Table 4 that the average number of colonies per exposition was greater in winter (10.1) followed by spring (9.6), autumn (9.4) and summer (4.9).

Discussion

Table 2 - Relative frequency of airborne fungi isolated in Baixada Santista according to months (August 1975/July 1976).

Symbols: * = Frequency above of 10%

Genus	Month/number of exposures											
	A/25	S/25	O/20	N/20	D/25	J/18	F/19	M/24	A/30	M/20	J/25	J/20
<i>Penicillium</i> *	60.0	44.0	50.0	50.0	44.0	44.0	26.3	41.7	55.0	65.0	64.0	60.0
<i>Cladosporium</i> *	84.0	60.0	70.0	50.0	20.0	18.7	36.8	25.0	45.0	55.0	48.0	65.0
<i>Aspergillus</i> *	16.0	8.0	25.0	20.0	24.0	16.7	21.0	37.5	45.0	35.0	16.0	20.0
<i>Epicoccum</i> *	32.0	60.0	55.0	10.0	8.0	5.6	10.0	4.2	15.0	15.0	20.0	40.0
<i>Fusarium</i> *	8.0	28.0	30.0	15.0	28.0	11.1	21.0	16.7	35.0	15.0	-	-
<i>Aureobasidium</i> *	8.0	24.0	15.0	20.0	16.0	16.7	10.5	20.8	15.0	10.0	20.0	5.0
<i>Neurospora</i> *	20.0	8.0	10.0	10.0	4.0	11.1	10.5	8.3	15.0	15.0	12.0	15.0
<i>Curvularia</i> *	8.0	8.0	20.0	-	16.0	5.6	15.8	8.3	10.0	-	16.0	15.0
<i>Rhizopus</i> *	8.0	4.0	15.0	-	16.0	11.1	10.5	8.3	10.0	20.0	12.0	5.0
<i>Phoma</i>	20.0	12.0	10.0	5.0	8.0	11.1	5.3	4.2	10.0	-	4.0	10.0
<i>Alternaria</i>	12.0	8.0	20.0	10.0	-	5.6	5.3	4.2	5.0	5.0	-	10.0
<i>Pestalotia</i>	8.0	4.0	-	-	12.0	5.6	-	16.7	5.0	5.0	-	-
<i>Helminthosporium</i>	4.0	4.0	15.0	-	8.0	-	2.1	12.5	5.0	5.0	-	-
<i>Cephalosporium</i>	-	8.0	15.0	20.0	-	-	-	2.3	10.0	5.0	4.0	-
<i>Hunicola</i>	-	8.0	5.0	10.0	-	-	-	4.2	5.0	5.0	8.0	5.0
<i>Trichoderma</i>	-	8.0	5.0	5.0	4.0	-	5.3	4.2	-	5.0	4.0	-
<i>Nigrospora</i>	-	8.0	10.0	-	8.0	-	-	-	5.0	5.0	4.0	-
<i>Scopulariopsis</i>	4.0	4.0	-	5.0	-	11.1	-	-	5.0	5.0	5.0	-
<i>Geotrichum</i>	4.0	8.0	5.0	5.0	-	-	-	-	-	-	4.0	-
<i>Chaetomium</i>	-	4.0	5.0	-	-	-	-	-	5.0	5.0	4.0	-
<i>Stemphylillum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0	5.0	4.0	-
<i>Paecilomyces</i>	-	8.0	5.0	-	-	-	5.3	-	5.0	-	12.0	-
<i>Trichotecium</i>	-	8.0	-	-	4.0	-	-	-	5.0	-	-	-
<i>Streptomyces</i>	-	-	-	-	-	5.6	-	-	-	-	-	-
<i>Arthrinium</i>	-	-	5.0	5.0	4.0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mucor</i>	4.0	-	-	-	-	5.6	-	-	-	-	-	5.0
<i>Hemispora</i>	-	-	-	-	8.0	5.6	-	-	-	-	-	-
<i>Verticillium</i>	-	-	-	-	4.0	-	-	-	5.0	-	-	-
<i>Gliocladium</i>	-	-	-	-	-	5.6	-	-	-	5.0	-	-
<i>Botrytis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5.0
<i>Graphium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Microsporum</i>	-	-	-	-	4.0	-	-	-	5.0	-	-	-
<i>Stachybotrys</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pleospora</i>	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4.0
<i>Circinella</i>	-	4.0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NSF	40.0	64.0	35.0	50.0	28.0	27.8	10.5	20.8	35.0	10.0	36.0	25.0

As the seasons progress from winter to summer, the frequency of anemophilous fungi is observed to accordingly decrease. In Baixada Santista the highest insolation values are attained during winter and nebulosity have an inverse relationship. In spring, the insolation rate is lower and the nebulosity reaches its highest values. Therefore, these factors are not of preponderant significance in the annual distribution of anemophilous fungi since a smaller count is to be expected with greater insolation and the opposite is expected in regard to nebulosity. The relative humidity rate being relatively constant year round, temperature and pluviometric rates are of greater importance as regulating mechanisms for fungal frequency in the Baixada Santista. The atmospheric pressure can also be considered as an important regulator of fungal frequency.

From November to March, atypically low pressure period, fungal frequencies are smaller than in the predominantly high pressure period from April to October (Table 2). Through relative calm predominates throughout the year, wind currents and circulation seem to be an important factor in fungi spore dissemination. In the spring and summer (from October to March) when easterly winds prevail (January being an exception with its prevailing north western winds) these winds would conduct any air pollution inland and a way from the coast, significantly reducing air pollution in the area. Several conclusions can be drawn from the data in Table 5 regarding location, genera count, relative NSF frequency, and the number of colonies at each location. At Ponta da Praia, sampling station number 1 in Fig. 1, fewer colonies, number of genera and lower percentage of NSF were identified in relation to the other stations. This region, a type of peninsula surrounded by the ocean and Santos Harbour, is very well aerated, more scarcely habitated, and less industrialized and commercialized than the other regions. It may therefore be considered as a low level environmental pollution area yielding the lower rates mentioned above. While *Penicillium* and *Cladosporium* predominated at this station, *Fusarium* and *Aureobasidium* had higher frequencies than in the other stations (Table 3). The regions of Marapé and Vila Valença are adjacent and share common demographic, physiographic and topographic characteristics. This may account for the strong similarity in number of genera and NSF percentage and corresponding relative frequency of airborne fungi with *Penicillium*, *Cladosporium* and *Epicoccum* markedly present in both areas. *Aspergillus* was much more common in Vila Valença, however, than in Marapé. The Gonzaga station exceeds the afore mentioned stations at Ponta da Praia, Marapé and Vila Valença in number of genera, NSF frequency and number of colonies identified. This region is main commercial center of the sea border of São Vicente Island, with a greater demographic density, higher degree of urbanization and a consequently greater number of automotive vehicles (i.e. combustion engines) than any of the three areas mentioned above. At this station, the *Cladosporium*

Table 3 - Relative frequency of airborne fungi isolated from Baixada Santista by sampling stations

Genus	Sampling stations/Number of expositions				
	Gon- zaga 53	Ponta da Praia 55	Ma- rapé 53	Va- lença 49	Cu- batão 51
<i>Penicillium</i>	47.2	38.5	66.0	44.9	58.8
<i>Cladosporium</i>	56.6	51.9	37.7	42.9	54.9
<i>Aspergillus</i>	28.3	17.3	9.4	32.7	31.4
<i>Epicoccum</i>	35.8	13.5	20.8	18.4	29.4
<i>Fusarium</i>	17.0	32.7	5.7	12.2	19.6
<i>Aureobasidium</i>	22.6	32.7	11.3	8.2	2.0
<i>Neurospora</i>	5.7	9.6	7.5	18.4	17.7
<i>Curvularia</i>	9.4	5.8	9.4	8.2	19.6
<i>Rhizopus</i>	13.2	13.5	11.3	2.0	9.8
<i>Phoma</i>	17.0	3.9	5.7	8.2	7.8
<i>Alternaria</i>	13.2	5.8	3.8	8.2	3.9
<i>Pestalotia</i>	13.2	-	3.8	10.2	3.9
<i>Helminthosporium</i>	1.9	5.8	1.9	16.3	5.9
<i>Cephalosporium</i>	11.3	1.9	3.8	8.2	3.9
<i>Humicola</i>	9.4	3.9	1.9	6.1	-
<i>Trichoderma</i>	7.5	-	3.8	-	5.9
<i>Nigrospora</i>	9.4	-	3.8	4.1	-
<i>Saopulariopsis</i>	7.5	1.9	5.7	2.0	-
<i>Geotrichum</i>	5.7	-	-	2.0	3.9
<i>Chaetomium</i>	1.9	-	3.8	-	3.9
<i>Stemphylium</i>	7.5	-	1.9	-	-
<i>Paecilomyces</i>	3.8	-	-	2.0	3.9
<i>Trichotectium</i>	5.7	-	-	-	2.0
<i>Streptomyces</i>	1.9	-	1.9	4.1	-
<i>Arthrinium</i>	1.9	3.9	-	-	-
<i>Macon</i>	1.9	-	3.8	-	-
<i>Hemispora</i>	-	-	5.7	-	-
<i>Verticillium</i>	1.9	-	1.9	-	-
<i>Gliocladium</i>	1.9	-	-	2.0	-
<i>Botrytis</i>	1.9	-	-	-	-
<i>Graphium</i>	-	-	1.9	-	-
<i>Microsporum</i>	-	-	-	2.0	-
<i>Stachybotrys</i>	-	-	-	2.0	-
<i>Pleospora</i>	-	-	-	-	2.0
<i>Circinella</i>	-	-	-	-	2.0
NSF	37.7	17.3	32.1	32.7	45.1

easterly winds prevail (January being an exception with its prevailing north western winds) these winds would conduct any air pollution inland and a way from the coast, significantly reducing air pollution in the area. Several conclusions can be drawn from the data in Table 5 regarding location, genera count, relative NSF frequency, and the number of colonies at each location. At Ponta da Praia, sampling station number 1 in Fig. 1, fewer colonies, number of genera and lower percentage of NSF were identified in relation to the other stations. This region, a type of peninsula surrounded by the ocean and Santos Harbour, is very well aerated, more scarcely habitated, and less industrialized and commercialized than the other regions. It may therefore be considered as a low level environmental pollution area yielding the lower rates mentioned above. While *Penicillium* and *Cladosporium* predominated at this station, *Fusarium* and *Aureobasidium* had higher frequencies than in the other stations (Table 3). The regions of Marapé and Vila Valença are adjacent and share common demographic, physiographic and topographic characteristics. This may account for the strong similarity in number of genera and NSF percentage and corresponding relative frequency of airborne fungi with *Penicillium*, *Cladosporium* and *Epicoccum* markedly present in both areas. *Aspergillus* was much more common in Vila Valença, however, than in Marapé. The Gonzaga station exceeds the afore mentioned stations at Ponta da Praia, Marapé and Vila Valença in number of genera, NSF frequency and number of colonies identified. This region is main commercial center of the sea border of São Vicente Island, with a greater demographic density, higher degree of urbanization and a consequently greater number of automotive vehicles (i.e. combustion engines) than any of the three areas mentioned above. At this station, the *Cladosporium*

genus predominated, greater than at any other station, followed by *Penicillium* and *Epicoccum*, this latter also exceeding frequencies found at the other locations.

Table 4 - Seasonal distribution of airborne fungi in the Baixada Santista (number of colonies and relative frequencies).

Symbols: * = Number of expositions; ** = Number of colonies; *** = Relative frequencies

Genus	Spring/65*		Summer/60*		Autumn/63*		Winter/70*	
	N.C.**	R.F.***	N.C.	R.F.	N.C.	R.F.	N.C.	R.F.
<i>Penicillium</i>	86	43.1	68	40.0	199	61.9	104	58.6
<i>Cladosporium</i>	142	53.8	26	23.3	79	49.2	188	65.7
<i>Aspergillus</i>	35	21.5	30	23.3	68	34.9	27	15.8
<i>Epicoccum</i>	53	29.2	8	8.3	13	15.9	86	38.6
<i>Fusarium</i>	40	26.2	23	18.3	19	17.5	13	8.6
<i>Aureobasidium</i>	30	20.0	26	13.3	17	14.3	17	14.3
<i>Neurospora</i>	15	7.7	5	8.3	22	12.7	46	17.1
<i>Curvularia</i>	13	12.3	15	11.7	6	6.3	16	11.4
<i>Rhizopus</i>	19	7.7	8	13.3	16	12.7	23	7.1
<i>Phoma</i>	12	9.2	5	6.7	3	4.8	22	12.9
<i>Alternaria</i>	28	10.8	7	5.0	2	3.2	19	8.6
<i>Pestalotia</i>	4	3.1	8	8.3	16	6.3	8	7.1
<i>helminthosporium</i>	8	9.2	7	10.0	4	4.8	6	1.4
<i>Cephalosporium</i>	11	10.8	3	1.7	26	7.9	2	2.9
<i>Humicola</i>	8	6.6	-	-	11	7.9	5	2.9
<i>Trichoderma</i>	5	4.6	3	3.3	3	4.8	1	1.4
<i>Mycospora</i>	10	9.2	-	-	2	3.2	1	1.4
<i>Scopulariopsis</i>	2	1.5	3	3.3	6	6.3	8	2.9
<i>Geotrichum</i>	2	3.1	-	-	1	1.6	10	4.3
<i>Chaetomium</i>	1	1.5	-	-	6	3.2	4	2.9
<i>Stemphylium</i>	-	-	4	1.7	9	6.3	-	-
<i>Paecilomyces</i>	2	1.5	2	1.7	1	1.6	5	2.9
<i>Trichotectum</i>	1	1.5	-	-	-	-	4	4.3
<i>Streptomyces</i>	-	-	1	1.7	12	4.8	-	-
<i>Arthrinium</i>	13	4.6	-	-	-	-	-	-
<i>Macon</i>	-	-	1	1.7	-	-	3	2.9
<i>Hemiclora</i>	1	1.5	6	3.3	-	-	-	-
<i>Vorticillium</i>	1	1.5	-	-	20	1.6	-	-
<i>Gliocladium</i>	-	-	1	1.7	1	1.6	-	-
<i>Botrytis</i>	-	-	-	-	-	-	1	1.4
<i>Graphium</i>	-	-	-	-	5	1.6	-	-
<i>Microsporum</i>	1	1.5	-	-	-	-	-	-
<i>Stachybotrys</i>	-	-	-	-	-	-	1	1.4
<i>Pleospora</i>	-	-	-	-	-	-	1	1.4
<i>Circinella</i>	-	-	-	-	-	-	1	1.4
NSF	81	44.4	38	23.3	25	22.2	85	40.0

Table 5 - Distribution of sampling stations, number of genera and of colonies, and relative frequency of Non Sporulating Fungi (NSF)

Sampling stations	Number of genera(35)	NSF %	Number of colonies
Ponta da Praia	16	17.3	337
Marapé	25	32.1	378
Vila Valença	23	32.7	430
Gonzaga	29	37.7	513
Cubatão	21	45.1	563

The region of Cubatão presented rates which become quite interesting under analysis. In theory, a reduced number of genera would indicate a smaller percentage frequency of NSF, e.g. Ponta da Praia, but that is not case here. The ecosystem of Cubatão, an industrial center, is entirely different from the other regions. Environmental pollution is much greater here, where dense smoke can be seen emerging from the stacks and towers of oil refineries, ironworks and several other industries concentrated in this area. As this region is backed up against the Serra do Mar Mountain range, at the northern most end of the coastal plane, prevailing southerly and southeasterly winds tend to maintain the airborne pollutants concentrated in this area. When the wind comes from the North, the reddish smoke of Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA), composed principally of iron oxide, spreads out for several kilometers along the coast. As south and southeasterly winds predominate however, the pollution tends to remain in the region, confined by the mountain range. In this manner, the population density wind distribution, industrial concentration and climate must certainly influence the fungi genera (21) and number of colonies (563) in Cubatão (Table 5). Regarding the rate of NSF in this region (the highest obtained), it may be deduced that chemical pollution inhibits the normal fungi sporulation mechanisms, causing them to reproduce vegetatively. In a previous study carried out in a densely populated region (Greater São Paulo) emitting high rates of atmospheric pollution, 53 fungi genera were isolated, 63.8% of which were found to be NSF (6). It must be emphasized that the region of São Paulo lies nearly 50 kilometers from Cubatão, separated from it by the Serra do Mar mountain range. Therefore the hypothesis now proposed is strengthened by the comparison between the two studies, since in observing the NSF frequencies in Table 5 an obvious difference can be seen between the region of Cubatão (more polluted) and Ponta da Praia (less polluted). Studying the results of

the χ^2 distribution test of NSF frequencies that indicated $\chi^2 = 9.4$ $\chi^2 p = 1\%$ or $9.4 > 6.64$, this ecological difference between Cubatão and Ponta da Praia, which is not merely chance but statistically significant.

Referring to the other collecting points, no significance has been obtained. Only between the regions of Gonzaga (commercial center) and Ponta da Praia, has been obtained a rate of NSF frequency that could be statistically significant, that is, $\chi^2 = 5.56$ and $\chi^2 p = 2\%$ or $5.56 > 5.41$. In this manner, depending upon general studies, including an analysis of other area rates and the standardization of mycological techniques, the NSF frequencies in the atmosphere of certain regions can be used as a microbiological indicator of environmental pollution.

References

1. Agarwal, M.K.; Shrivpuri, D.N. & Mukherji, K.G. - Studies on the allergenic fungi spores of the Delhi, India, metropolitan area. *J. Allergy*, 44:193-203, 1969.
2. Alvarez, J.C. & Castro, J.F. - Quantitative studies of airborne fungi of Havana in each of the twenty four hours of the day. *J. Allergy*, 23:259-264, 1952.
3. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 14.ed. New York, 1975.
4. Blackey, C.H. - Experimental researches on the causes and nature of *Catarrhus aestivus*. London, Ballière-Tindal & Cox. London, Dawson's Pall Mall, 1959.
5. Cueva, J.; Vertig, M.C.; Castillo, V. & Juarez, A.X. - Hongos atmosféricos de la ciudad de Pachuca, Hidalgo, Mexico. *Alergia (Mex.)*, 8:113-118, 1961.
6. Gambale, W.; Purchio, A. & Croce, J. - Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 8:74-79, 1977.
7. Hopkins, J.G.; Benham, R.W. & Kesten, B.M. - Asthma due to a fungus *Alternaria*. *J. Amer. Med. Assoc.*, 94:6, 1930.
8. Lacaz, C.S.; Mendes, E.; Pinto, R.J.R.; Cardoso, T. & Luchetti, L.C.H. - Fungos anemófilos das cidades de São Paulo e Santos (Brasil). *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 13:187-193, 1958.
9. Morrow, M.B.; Meyer, G.H. & Prince, H.E. - A summary of airborne mold surveys. *Ann. Allergy*, 22:575-587, 1964.
10. Ordman, D. & Etter, K.G. - The airborne fungi in Johannesburg. *S. Afric. Med. J.*, 30:1054, 1956.
11. Requejo, H.V. - Microflora atmosférica de la ciudad de Trujillo (Peru). III - Generos aislados durante el año de 1971. *Mycopathologia (Den Haag)*, 56:15-20, 1975.
12. Salvaggio, J.; Seabury, J. & Schoenhardt, E.A. - New Orleans asthma. V - Relationship between Charity Hospital Asthma admission rates, semi quantitative pollens and fungal spore counts and total particulate aerometric sampling data. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 48:96-114, 1971.
13. Santos, E.O. - Características climáticas. In: - A Baixada Santista: aspectos geográficos. São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras/Edusp, v.1, p.95-150, 1965.
14. Simard, R.E. - Yeast as an indicator of pollution. *Mar. Pollut. Bull.*, 2:123-125, 1971.

PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE FARINHA DE BABACU, ATRAVÉS DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA NÃO CONVENCIONAL

Marilena Aquino de Muro

Yong K. Park

Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola UNICAMP
Caixa Postal 6121
13100 Campinas SP, Brasil

& José Osvaldo Bezerra Carioca

Núcleo de Fontes Não-Convencionais de Energia
Universidade Federal do Ceará
Caixa Postal 3010
60000 Fortaleza CE, Brasil

Resumo

Fermentação não-convencional de materiais amiláceos, tais como milho, mandioca, babaçu e arroz. Este processo inclui, numa só etapa, a sacarificação e fermentação, sem cozimento. O amido de arroz teve rendimento maior que qualquer outro amido, por ser mais suscetível às enzimas amilolíticas. O amido de babaçu apresentou menor rendimento devido à interferência de materiais fibrosos, que envolvem sua estrutura, tendo rendimento, significativamente maior, quando tratado, principalmente, por hemicelulase de *Aspergillus niger*. O rendimento, em etanol, do amido de babaçu foi ainda maior, se fermentado a 35°C, quando a ação das enzimas celulolíticas é mais intensa.

Summary

Production of ethanol from raw babassu starch by a nonconventional fermentation method

Babassu, corn, tapioca and rice starches were fermented by the nonconventional fermentation method, which is consisted of saccharification and fermentation of starch simultaneously (one-step process) without cooking. It was found that productivity of ethanol from rice starch was higher than other starch used. The lowest productivity of ethanol was obtained from babassu starch. The results indicated that rice starch is highly susceptible to amylolytic enzyme as compared to other starches. On the contrary, babassu starch is less susceptible to the enzyme because of interference of fibrous materials present. The barrier from fibrous materials could be eliminated by using cellulolytic enzymes, mainly xylan hydrolyzing enzyme from *Aspergillus niger*. Fermentation at 35°C gave higher ethanol productivity. It is apparent that higher temperature elevated activity of cellulolytic enzyme.

Introdução

Atualmente, a produção de etanol é obtida através da fermentação de açúcares e materiais amiláceos. Os açúcares podem ser, diretamente, fermentados pela levedura, enquanto que os materiais amiláceos devem ser, primeiramente, sacarificados por enzimas amilolíticas. Somente depois os açúcares, então formados, são fermentados, até etanol, pela levedura. As etapas de cozimento, liquefação do amido, sacarificação, fermentação e destilação, que compõem o método convencional para a fermentação de materiais amiláceos, elevam, consideravelmente, o custo final de produção de etanol.

Com a finalidade de reduzir esse custo, foi estudada, recentemente, a utilização de um método que incluisse, numa só etapa, a sacarificação e fermentação do amido de mandioca, sem cozimento (9). Posteriormente, foi investigada a aplicação deste método não-convencional de fermentação, para diversos amidos (5). Verificou-se a existência, entre os substratos, de diferenças, de natureza físico-químicas, que interferem no rendimento, já que, em comparação ao método convencional, os amidos de milho e mandioca mantiveram o mesmo rendimento, enquanto que, no amido de batata e babaçu, o rendimento foi, sensivelmente, menor. Em outro trabalho (4), verificou-se que o amido de babaçu é mais resistente à ação de enzimas amilolíticas.

Neste trabalho, o objetivo foi aumentar o rendimento da fermentação de farinha de babaçu, através de modificações do método não-convencional.

Material e Métodos

Microrganismos - *Aspergillus awamori* NRRL 3112, *Aspergillus niger* ATCC 46890 (6), *Trichoderma reesei* QM 9414 e *Saccharomyces cerevisiae* (levedura de panificação "Fleischmann Co.", Brasil).

Figura 1 - Fermentação alcoólica de vários amidos pela mistura de levedura e amiloglucosidase comercial.

Símbolos: -○- = arroz; -●- = milho; -△- = mandioca; -▲- = babaçu

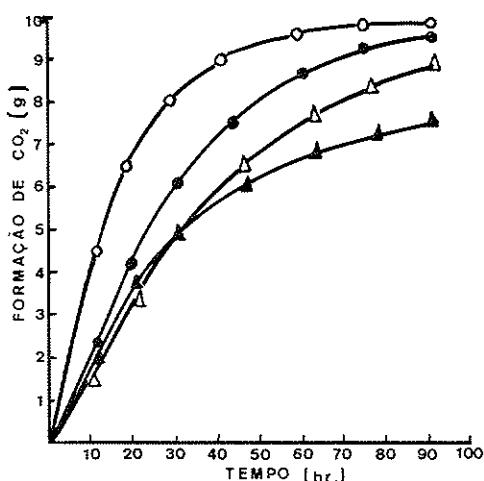
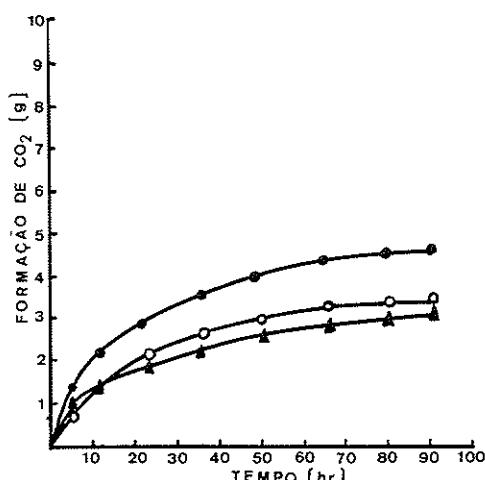


Figura 2 - Fermentação alcoólica de amido de babaçu pela mistura de levedura, amiloglucosidase (*A. awamori*) e enzimas celulolíticas.

Símbolos: -○- = amiloglucosidase sómente; -●- = amiloglucosidase mais hemicelulase de *A. niger*; -▲- = amiloglucosidase mais celulase de *T. reesei*



Materiais amiláceos - Amido de mandioca (91,62g de subst. redutoras/100g de amido); amido de milho (Maizena, 88,08g de subst. redutoras/100g de amido); farinha de arroz (variedade americana-agulhinha, tipo 2, 73,34g de subst. redutoras/100g de farinha) e farinha de babaçu (42,34g de subst. redutoras/100g de farinha).

Enzimas - a. Amiloglucosidase fúngica foi preparada como descrito em publicações anteriores (5, 9): 20g de mistura de farelo de trigo e água (1:1) foram colocados em frascos erlenmeyer de 500ml e esterilizados a 121°C por 30min.; uma alçada de esporos de *A. awamori* e *A. niger*, respectivamente, foram inoculados no farelo e os frascos incubados, a 30°C, por 3 dias. Após esse tempo, todo o farelo fermentado foi usado como fonte de amiloglucosidase; b. Celulase de *Trichoderma reesei* foi produzida da mesma maneira que a amiloglucosidase fúngica, sendo a enzima bruta obtida por extração aquosa, com precipitação em etanol; c. Amiloglucosidase comercial (*A. niger*) e hemicelulase comercial "Cellulosin" (*A. niger*) foram usadas.

Determinação da atividade de amiloglucosidase - A determinação foi feita conforme método descrito por "Technical Information of Miles Laboratory - Diazyme assay procedure" (8). O ensaio está baseado na determinação da quantidade de glucose, formada na mistura de 1ml de solução de amido 4%, pH 4,0, durante 1 hora de incubação, a 60°C. Uma unidade de atividade de amiloglucosidase foi definida como 1mg/hora de glucose, formada a partir do amido, nas condições do ensaio.

Determinação da atividade de xilanase - O ensaio está baseado na determinação da quantidade de xilose, formada na mistura de 2,5ml de solução de xilana 0,1%, 2,0ml de tampão citrato-fosfato 0,1M (pH 4,5) e 0,5ml de solução de enzima (1mg/ml), durante 30 min. de incubação, a 50°C. As substâncias redutoras foram determinadas pelo método Somogyi-Nelson. Uma unidade de atividade de xilanase foi definida como 1µg/min. de xilose, nas condições do ensaio.

Determinação da atividade de degradação de papel de filtro - O ensaio está baseado na determinação da quantidade de glucose, formada na mistura de 1ml de tampão citrato de sódio 0,05M (pH 4,8), 0,5ml de solução de enzima (1mg/ml) e uma tira de papel de filtro 1 x 6cm (50mg), durante 1 hora de incubação, a 50°C. As substâncias redutoras foram determinadas pelo método Somogyi-Nelson (3, 7). Uma unidade de atividade de degradação de papel de filtro foi definida como 1µg/min. de glucose, nas condições do ensaio.

Figura 3 - Fermentação alcoólica de amido de babaçu pela mistura de levedura e amiloglucosidase (*A. awamori*) sem ou com enzimas celulolíticas. Símbolos: -o- = amiloglucosidase somente; -•- = amiloglucosidase mais hemicelulase

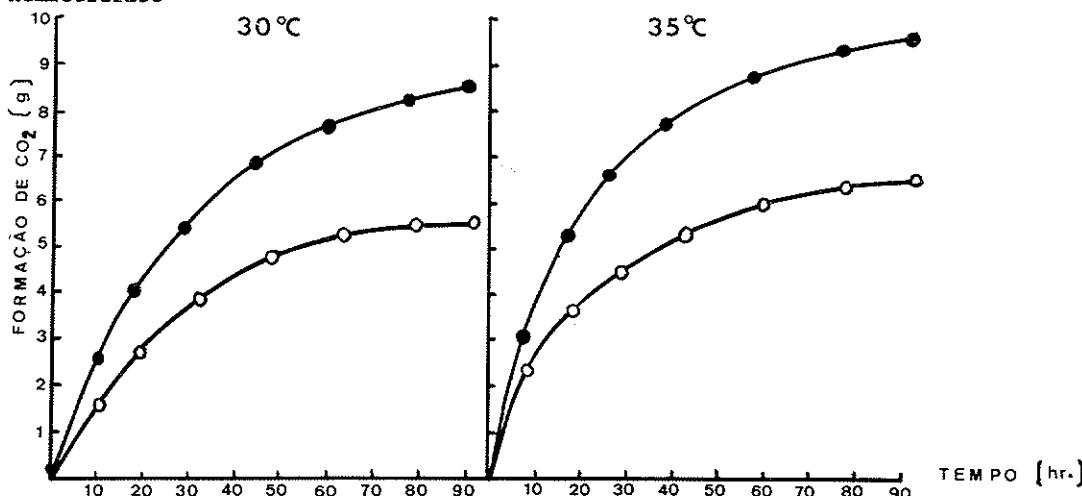


Tabela 1 - Dados representativos da fermentação alcoólica de vários amidos pela mistura de levedura e amiloglucosidase comercial ($T = 30^{\circ}\text{C}$).

Símbolos: * = A quantidade de amiloglucosidase comercial foi 2ml (equivalente a 330240 unidades) num frasco erlenmeyer de 500ml.

Amidos	Total de substâncias redutoras (g)	Formação teórica CO_2 (g)	Formação real CO_2 (g)	Rendimento teórico em etanol (%)
Milho	20.00	9.78	9.36	95.70
Mandioca	20.00	9.78	8.90	91.00
Arroz	20.00	9.78	9.78	100.00
Babaçu	20.00	9.78	7.65	78.22

Determinação da atividade de CMCase - O ensaio está baseado na determinação da quantidade de glucose, formada na mistura de 9ml de solução de carboximetilcelulose (CMC) 0,25% em tampão acetato 0.1M (pH 4,5) e 1ml de solução de enzima (1mg/ml), durante 1 hora de incubação, a 40°C . As substâncias redutoras foram determinadas pelo método Somogyi-Nelson (3, 7). Uma unidade de atividade de CMCase foi definida como 1 $\mu\text{g}/\text{min}$. de glucose, nas condições do ensaio.

Procedimento para a fermentação alcoólica - Já foi descrito em publicações anteriores (5, 9), exceto pela adição de 200mg (equivalente a 348 unidades de atividade de xilanase) de hemicelulase ou 200mg (equivalente a 2100 unidades de degradação de papel de filtro e 8680 unidades de CMCase) de celulase. 20g ou 9,83g de amido, respectivamente, com base nas substâncias redutoras, determinadas pelo método Somogyi-Nelson (3, 7); 10g de farelo fermentado de *A. awamori* (equivalente a 50560 unidades) ou de *A. niger* (equivalente a 7360 unidades), respectivamente, como fonte de enzima; 6ml de suspensão de levedura a 15% e 300ml de água destilada, foram colocados em frascos erlenmeyer de 500ml e o pH ajustado para 3,5, com H_2SO_4 10%. A perda de peso dos frascos foi verificada durante o tempo de fermentação e, após 100 horas de fermentação, foi medido o teor de etanol.

Determinação do etanol, produzido na fermentação - O método para medição (2), requer 1ml de solução fermentada, 5ml de água destilada e 4ml de reagente de Scott-Wilson, que são colocados num tubo com injeção de ar. Em outro tubo, são colocados 9ml de solução de dicromato de potássio. O conjunto fechado é aquecido, em banho-de-água fervente, durante 10 min. e a absorbância lida a 605nm, em espectofotômetro Coleman 295.

Tabela 2 - Dados representativos da fermentação alcoólica de amido de babaçu pela mistura de levedura, amiloglucosidase de *A. awamori* e enzimas celulolíticas ($T = 30^{\circ}\text{C}$).

Símbolos: Quantidade de amiloglucosidase de *A. awamori* equivalente a 50560 unidades

Enzimas	Total de substâncias redutoras (g)	Formação teórica CO_2 (g)	Formação real CO_2 (g)	Rendimento teórico em etanol (%)
Amiloglucosidase (<i>A. awamori</i>)	9.83	4.81	3.40	70.69
Amiloglucosidase + celulase (<i>T. reesei</i>)	9.83	4.81	3.30	68.61
Amiloglucosidase + hemicelulase (<i>A. niger</i>)	9.83	4.81	4.45	92.52

Resultados e Discussão

O amido, a baixo pH, como pH 3,5, pode ser, substancialmente, hidrolisado até glucose, pela amiloglucosidase de *A. awamori* ou *A. niger*, a qual, apesar de ter pH ótimo de atividade, entre 4,0 e 5,0, ainda mantém considerável atividade a pH 3,5. Paralelamente, no pH 3,5, a levedura pode fermentar com eficiência o açúcar, bem como é possível evitar a contaminação microbiológica. Tomando-se como base a verificação de Balls & Schwimmer (1), de que o amido cru pode ser hidrolisado, total-

mente em açúcar, pode-se então, efetuar, simultaneamente, as etapas de sacarificação do amido e fermentação do açúcar, a pH 3,5, sem cozimento.

Anteriormente, foi estudada a aplicação deste processo, na fermentação de amido de milho, mandioca, batata e babaçu (5, 9). No presente trabalho, foi acrescentado o amido de arroz. Os resultados (Figura 1, Tabela 1) mostram que o amido de arroz foi eficientemente fermentado a etanol com 100,00% de rendimento, enquanto que o amido de babaçu apresentou o baixo rendimento, de 78,22%.

A causa da ineficiência de transformação do amido de babaçu é sua menor suscetibilidade à ação enzimática (4). Pressupondo que o grão de amido de babaçu contenha materiais fibrosos, foi adicionado ao amido, diversas enzimas celulolíticas, produzidas por *A. niger* e *Trichoderma reesei*. Os resultados (Figura 2, Tabela 2) mostram que a enzima celulolítica de *A. niger* aumentou, significativamente, o rendimento do etanol, com 92,52% de rendimento, em comparação aos 70,69% do controle, sem a enzima adicionada. A enzima celulolítica de *Trichoderma reesei* não alterou o rendimento.

A enzima celulolítica de *A. niger* é composta, principalmente, de hemicelulase, enzima que hidrolisa, especialmente, hemicelulose, xilana e arabinó-xilana. Portanto, a função da enzima celulolítica foi liberar o amido de babaçu, provavelmente cercado por materiais fibrosos, tornando-o mais suscetível ao ataque de enzimas amilolíticas e, assim, aumentando o rendimento da fermentação, em 31%.

Também foi motivo de investigação a influência da temperatura, na transformação do amido de babaçu em etanol, por este processo. A temperatura ótima da amiloglucosidase de *A. awamori* ou de *A. niger* está entre 55-60°C e a da enzima celulolítica de *A. niger*, em torno de 40°C. A levedura fermenta, adequadamente, os açúcares em etanol, a temperaturas de 30-35°C. Por isso, foi comparado o rendimento da fermentação, entre as temperaturas de 30 e 35°C, respectivamente (Figura 3 e Tabela 3). A 30°C, a enzima celulolítica de *A. niger* aumentou o rendimento da fermentação, em 57,62%. A 35°C, a enzima celulolítica de *A. niger* aumentou o rendimento, em 46,15%. A 3°C a fermentação apresentou 15% a mais do rendimento em etanol, em comparação à 30°C.

O rendimento, em etanol do amido de babaçu foi maior, quando foi usada amiloglucosidase comercial (Tabela 1), porque esta, tem atividade bem maior que amiloglucosidase de *A. awamori* (Tabela 2 e 3).

Comparando-se os rendimentos em etanol, dos ensaios de fermentação a 30°C, somente com amiloglucosidase fúngica (Tabela 2 e 3), conclui-se que, o menor teor de substâncias redutoras, de 9,83g, é mais eficiente, para a conversão do amido em etanol, na atividade de amiloglucosidase de *A. awamori*, usada neste trabalho.

Tabela 3 - Dados representativos da fermentação alcoólica de amido de babaçu a diferentes temperaturas.

Símbolos: * = Quantidade de amiloglucosidase de *A. awamori* equivalente a 50560 unidades

	Temperatura (°C)	Total de substâncias redutoras (g)	Formação teórica CO ₂ (g)	Formação real CO ₂ (g)	Rendimento teórico em etanol (%)
30	Amiloglucosidase (<i>A. awamori</i>)	20.00	9.78	5.40	55.18
	Amiloglucosidase + hemicelulase (<i>A. niger</i>)	20.00	9.78	8.50	86.98
35	Amiloglucosidase (<i>A. awamori</i>)	20.00	9.78	6.22	63.60
	Amiloglucosidase + hemicelulase (<i>A. niger</i>)	20.00	9.78	9.50	92.96

Agradecimentos

Trabalho realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp), Brasil (Proc. IC 83/1531-2).

Referências Bibliográficas

1. Balls, K. & Schwimmer, S. - Digestion of raw starch. *J. Biol. Chem.*, 156:203-210, 1944.
2. Kaye, S. & Haag, H.B. - Determination of ethyl alcohol. In: - Frankel, S. & Reitman, S., eds. - *Gradwohl's clinical laboratory methods and diagnosis*. USA, Saint Louis, The C.V. Mosby, vol.1, chap.18, p.388-341, 1963.
3. Nelson, N. - A photometric adaptation of the Somogyi-method for determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380, 1944.
4. Park, Y.K.; Marancenbaum, E. & Morga, A.A. - New starch resource: study of some characteristics of the starch by enzyme methods. *J. Agric. Food. Chem.*, 26:1198-1200, 1978.
5. Park, Y.K. & Rivera, B.C. - Alcohol production from various enzyme-converted starches with or without cooking. *Biotechn. and Bioeng.*, 24:495-500, 1982.
6. Park, Y.K.; Zenin, C.T.; Ueda, S.; Martins, C.O. & Martins Neto, J.P. - Microflora in beiju and their biochemical characterisitics. *J. Ferment. Technol.*, 60:1-4, 1982.
7. Somogyi, M. - A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160:61-68, 1945.
8. Technical Information Miles Laboratories Inc. - *Diazyme Assay Procedure*, n° 5:125, 1966.
9. Ueda, S.; Zenin, C.T.; Monteiro, D.A. & Park, Y.K. - Production of ethanol from raw cassava starch by a nonconventional fermentation method. *Biotechn. and Bioeng.*, 23:291-299, 1981.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Adelantos en Microbiología y Enfermedades Infecciosas (Buenos Aires), vol.2, 1983.

Trata-se de uma coletânea de revisões que abrangem assuntos microbiológicos e imunológicos de interesse para a América-latina, editada em conjunto pela Universidade de Buenos Aires e Instituto Venezolano de Investigações Científicas.

Neste segundo volume (1983) constam revisões, algumas bastante, outras razoavelmente atualizadas sobre:

- Febre tifóide (Rodrigues Leiva, M. - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Católica do Chile)
- Lipopolissacarídeo de *Brucella* (Moreno, E. - Escola de Medicina Veterinária, Universidade da Costa Rica)
- Vacinas contra diarréias bacterianas (Levine, M.M. & Lanata, C. - Centro para Desenvolvimento de Vacinas, Universidade de Maryland, USA)
- Febre hemorrágica Argentina (Weissenbacher, M. & Damonte, E.B. - Faculdade de Medicina, Universidade de Buenos Aires)
- O neutrófilo polimorfonuclear nas infecções: defensor ou mediador patogênico? (Laguens, R.P.; Gonzales, P.H. & Ponzinibbio, C. - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nacional de la Plata, Argentina).

Cesar Martins de Oliveira
 Instituto de Microbiologia UFRJ
 Bloco I - Ilha do Fundão
 21941 Rio de Janeiro RJ

PAHO/WHO - Rapid laboratory diagnosis of acute bacterial and viral infections: manual. Atlanta, Center for Disease Control, PAHO/WHO, 1982.

Rapid laboratory diagnosis of bacterial and viral infections - reúne uma série de fascículos preparados no Center for Disease Control, entre 1977 e 1982, aparentemente para serem utilizados como roteiros em seus cursos de imunologia. Disso resultou um livro heterogêneo, no que concerne ao tempo em que suas diferentes seções foram escritas e, consequentemente, algumas delas apresentam lacunas de informação sobre muitos progressos tecnológicos só recentemente introduzidos no florescente campo dos imunodiagnósticos com anticorpos marcados. Assim, não há qualquer menção aos anticorpos monoclonais, à tentativa de melhoria dos conjuntos pela marcação de imunoglobulinas com coenzimas, ao diagnóstico imunoenzimático da rubéola primária aguda e à demonstração de抗igenos de *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e herpesvirus, diretamente nas secreções patológicas humanas, através da enzimaimunoensaio (EIE) ou imunofluorescência.

O livro abrange seis capítulos básicos relacionados com terminologia imunológica, preparo e marcação de anticorpos com enzimas e fluorocromos, modo de relatar resultados sorológicos de EIE e, finalmente, uma seção sobre a importância do uso de pipetas calibradas na realização de testes imunológicos. O tópico sobre relato de resultados de EIE, adaptação de artigo publicado por deSevigne e Valler em 1980, é excelente e impressiona pela pertinência das discussões sobre real problema prático: transformar resultados de leituras espectrofotométricas em resultados facilmente inteligíveis pelos médicos clínicos. O capítulo sobre microscopia fluorescente é escrito por William B. Cherry, um dos pioneiros na aplicação da imunofluorescência no diagnóstico rápido das infecções bacterianas. Embora escrito em 1977, é o ponto alto do livro, contendo informações preciosas sobre o uso da luz incidente, escolha do equipamento mais adequado a cada propósito e de como obter boas microfotografias.

A parte de aplicação prática do livro é sucinta. Consta de apenas três roteiros técnicos de trabalho em laboratório: diagnóstico da rotavírose pelo EIE, evidencia-

ção de抗igenos de *Legionella pneumophila* através da aglutinação passiva e calibração espectrofotométrica de pipetas.

Apesar das lacunas, o livro pode ser de grande utilidade aos estudantes e professores de cursos regulares de imunologia e aos microbiologistas clínicos em geral, especialmente aqueles interessados em familiarizar-se com as bases imunológicas de métodos laboratoriais, potencialmente úteis, no diagnóstico rápido das infecções.

Marcelo Magalhães

Centro de Microbiologia e Imunologia

Rua 7 de Setembro, 508

50000 Recife PE

Sociedade Brasileira de Microbiologia, Faculdade de Ciências Agrárias de Botucatu - Curso sobre Controle Químico, Físico e Biológico da Digestão Anaeróbia. Botucatu, 9-13 abril, 1984.

No período de 09 a 13 de abril deste ano, a SBM - Sociedade Brasileira de Microbiologia e a FCA/UNESP - Faculdade de Ciências Agrárias, de Botucatu, realizaram curso de extensão universitária sobre "Controle químico, físico e biológico da digestão anaeróbia", sob coordenação do Prof. José Santo Goldoni, do Departamento de Tecnologia de Produtos Agropecuários.

O curso foi ministrado nas dependências da FCA-Botucatu, totalizando 40 horas/aula. Contou-se com a colaboração de profissionais, com profundos conhecimentos e que realizam pesquisas na área de digestão anaeróbia, vindos do IPT - Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S/A, da CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, ESALQ/USP - Escola Superior de Agronomia Luiz de Queiroz, e de alunos do curso de Pós-graduação em Agronomia da FCA.

Da programação, constaram os seguintes assuntos: introdução e considerações gerais sobre digestão anaeróbia (Clarita S. Peres - IPT); controles bioquímicos e microbiológicos do processo de digestão anaeróbia (Clarita S. Peres e Maria da Glória Figueiredo - IPT); controle químico do processo de digestão anaeróbia (Yukie Saito Hirato e Elso Vitoratto - IPT); modelos de reatores e controle físico da digestão anaeróbia (Sonia Maria Manso Vieira - CETESB); influência dos substratos empregados na digestão anaeróbia (Antonio Carlos Gonçalves - IPT); aplicações dos efluentes/pesquisa de patogênicos (Maria Therezinha Martins - CETESB); aplicações do biogás e dos efluentes (Paulo de Carvalho Torres - ESALQ/USP e Rubens Boerngen - IPT); a experiência com digestão anaeróbia na UNESP (Laércio Caetano, Luiz Motta e Sergio Luiz Monteiro Salles Filho da PG Energia na Agricultura - FCA).

Inscreveram-se 17 profissionais, sendo 13 da FCA, 2 do IB/UNESP - Rio Claro, 1 do IPT e 1 biólogo que pretende desenvolver atividades na área da digestão anaeróbia.

O curso abordou assuntos que ainda merecem estudos mais detalhados, que abrem perspectivas para novas linhas de pesquisa e que são de grande importância para solução de graves problemas, tais como: produção de metano como fonte alternativa de energia, a poluição e produção de biofertilizantes. As abordagens foram feitas com aulas teóricas e práticas sobre microbiologia, química e bioquímica do processo de digestão anaeróbia; substratos empregados na digestão anaeróbia; modelo de reatores; controle físico do processo; pesquisa de microrganismos patogênicos em efluentes; e aplicações do biogás e efluentes.

Os trabalhos foram desenvolvidos através de grupos e o aproveitamento dos participantes foi avaliado pelo acompanhamento individual e pela efetiva participação nas atividades realizadas.

Claudia Avanzi

SBM

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cidade Universitária USP

05508 São Paulo SP

Hollaender, Alexander & col. (Ed.) - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, vol.19, 485p., 1981.

"Engenharia" tem sido definida como profissão ou habilidade para o planejamento, desenho e construção de processos, equipamentos ou produtos; como arte ou ciência, cuida da aplicação de conhecimentos científicos e empíricos para a transformação de recursos naturais em formas adequadas para atendimento das necessidades humanas.

"Engenharia genética" passou a ser usada mais intensivamente, nos últimos 10 anos, entre os membros da comunidade científica, com o objetivo de representar a arte de combinar os conhecimentos da bioquímica, fisiologia, genética, microbiologia, entre outras áreas das ciências biológicas, para o planejamento, desenho e construção de genes, sua implantação em células hospedeiras, autorreplicação e expressão, com vistas ao controle dos mecanismos de regulação celular para a obtenção de produtos de interesse particular.

O livro editado por Hollaender & col. faz parte do crescente volume de informações sobre a manipulação genética ou tecnologia de DNA-recombinante, dos últimos 10 anos. O texto congrega as contribuições apresentadas durante simpósio sob o mesmo título do livro, de 26-29 de maio de 1981, na Universidade de Illinois, Champaign-Urbana, Ill., EUA.

O conteúdo é iniciado por revisão e previsão sobre o uso de plasmídios como vetores para clonagem gênica. Os demais artigos parecem ter sido agrupados sob determinados aspectos, porém sem muita clareza, a saber: "Strategies: techniques and molecular systems (três artigos)"; "Strategies: Models and Problems (16 artigos)"; "Towards the development of marketable products (sete artigos)" e discussão sobre prioridades em pesquisa. São relacionados os conferencistas e participantes, com respectivos endereços e incluídos índices de táxons de microrganismos e de assunto.

João Salvador Furtado
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Case, M.E. - Transformation of *Neurospora crassa*. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S., eds. - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, vol.19, p.87-100, 1981.

O desenvolvimento de uma tecnologia do DNA recombinante em fungos filamentosos está ainda no seu período inicial. Isto se deve à dependência dessa tecnologia à descoberta de um vetor e do desenvolvimento de um processo de transformação também eficiente em fungos filamentosos. O que o capítulo pretendeu foi descrever tanto as técnicas de transformação, como os veículos de clonagem desde o início da sua utilização até atualmente em *Neurospora crassa*. É uma revisão atualizada sobre o assunto e de interesse àqueles que se dedicam à Genética de Fungos filamentosos. É uma pena, entretanto, que a autora se restrinja apenas a uma espécie em lugar de ampliar a revisão para outros fungos filamentosos.

João Lúcio de Azevedo
Deptº de Genética ESALQ
Caixa Postal 83
13400 Piracicaba SP

Shapiro, J.A.; Carbit, A.; Benson, S.; Caruso, M.; Laux, R.; Meyer, R. & Banuett, F. - Perspectives for the genetic engineering of hydrocarbon oxidizing bacteria. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S., eds. - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, Basic life Sciences, vol.19, p.101-102, 1981.

É descrita a ação dos plasmídios alk e xyl para oxidação dos n-alcanos e do tolueno ou xileno. A manipulação genética por meio de veículos de clonagem de amplo espectro é aventada, embora seja ressaltadas as dificuldades da expressão fenotípica destes gens. Estes estudos são ainda um campo aberto, aparentemente promissor.

Elisa G.C. Penido
Instituto de Microbiologia UFRJ
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Baron, L.S.; Kopecko, D.J.; McCowen, S.N.; Snellings, N.J.; Johnson, E.M.; Reid, W.C. & Life, C.A. - Genetic and molecular studies of the regulation of atypical citrate utilization and variable Vi antigen expression in enteric bacteria. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S., eds. - *Genetic engineering of microorganisms for chemicals*. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, vol. 19, p.175-194, 1981.

O trabalho focaliza dois aspectos relacionados com a expressão genética: propriedade determinada pelo plasmídio e a função codificada pelo cromossoma.

No concernente ao primeiro tópico são usados como materiais de estudo cepas de *E. coli* utilizadoras de citrato (*Cit⁺*) e resistentes a antibióticos cloranfenicol, tetraciclina ou a amicacina, cefalosporina e canamicina. A análise das características do *Cit⁺* é extensamente discutida em função dos resultados de experimentos de clonagem com técnicas de recombinação de DNA. Dentro do contexto da propriedade, utilização do citrato pelas cepas de questão, são considerados os possíveis aspectos bioquímicos envolvidos.

Ao tratar da função exercida pelo cromossoma, é utilizada a característica do antígeno Vi, componente da superfície celular de *Citrobacter freundii* e expressão dos genes via A e via B, locados em posições distintas no cromossoma. O aspecto interessante é a reversibilidade da expressão do antígeno Vi, além da transferência de via A ou via B em *E. coli*. É descrita a utilização do fago para a transposição de via B, que porta o material genético responsável pelo mecanismo de desencadeamento da reversibilidade da expressão do antígeno Vi para o plasmídio.

Enfim, é destacada a utilidade das diversas manipulações genéticas para o entendimento dos processos bioquímicos e dos sistemas de controle da regulação genética.

Thiuloshi Ioneda
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Ribbons, D.W. & Williams, P.A. - Diversity of genetic and biochemical traits of *Pseudomonads*. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S., eds. - *Genetic engineering of microorganisms for chemicals*. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, vol.19, p.211-232, 1981.

É extremamente vasta a lista de substratos que podem ser utilizados pelo gênero *Pseudomonas* como fontes de carbono ou de nitrogênio. Esta é uma indicação que, neste gênero de microrganismos, uma parte substancial do genoma esteja encarregada destas funções catabólicas.

Por outro lado, a taxonomia deste gênero, com base na homologia do RNA ribossômico, divide-o em 5 grupos, cujos teores GC variam intragrupo. Porém, apesar desta flexibilidade, algumas estirpes não são classificáveis, sendo designados *Pseudomonas* sp.

A espécie mais estudada, do ponto de vista genético, é *Pseudomonas aeruginosa* utilizando o mecanismo de transdução generalizada, não tendo sido ainda descrita a transdução especializada, embora a maioria das estirpes seja lisogênica. Quanto à

conjugação, foram descritos vários plasmídios e também transferência de gens cromossômicos. Foi descrita a existência de um fator F1, análogo ao de *Enterobactérias*.

Foram descritos plasmídios catabólicos que degradam, respectivamente, cânfora (CAM), salicilato (SAL), naftaleno (NAH), octano (OCT), toluatos (TOL), nicotina, o herbicida 2,4 diclorofenoxiacetato e os detergentes de alquilbenzeno sulfonatos, entre outros.

A caracterização destes plasmídios foi realizada: situam-se na faixa de 60 a 300 Md. Foram mais profundamente caracterizados os plasmídios OCT e TOL. Com eles foram construídos plasmídios híbridos, contendo uma região do plasmídio RP4, tendo porém, completa expressão da atividade catabólica.

Para a obtenção de mutantes defectivos no catabolismo foi utilizado meio contendo um análogo do substrato ideal como por exemplo fluoroacetamida, cloro-p-xileno, clorotolueno, bromotolueno, iodobenzoato, etc.

Os veículos de clonagem até agora descritos para *Pseudomonas* são plasmídios. Estes vetores de clonagem são plasmídios conjugativos de tamanho médio (50-60kb), promiscuos para diversas bactérias gram negativas ou plasmídios, não conjugativos, de tamanho pequeno. Foram também construídos cosmídios contendo DNA do fago I e segmentos do plasmídio de *Pseudomonas*.

O artigo contém uma excelente revisão dos estudos genéticos e moleculares já realizados em *Pseudomonas*.

Elisa G.C. Penido
Instituto de Microbiologia UFRJ
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Hager, L.P. - Mother nature likes some halogenated compounds. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S. - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, Basic life Sciences, vol.9, p.415-429, 1981.

O artigo retrata de forma extremamente didática os compostos orgânicos halogenados que ocorrem na natureza. A começar pela tiroxina, o hormônio tireoidiano encontrado em concentrações de 10^{-9} M em mamíferos. Entretanto, a riqueza de compostos halogenados é revelada ao colocar em foco os microrganismos, momento ao considerar os compostos com atividade biológica. Forma-se assim, um conjunto de antibióticos de origens diversas e produzidos por bactérias: pioluteronina contendo anel pirrólico diclorado; aureomicina com átomo de cloro no grupo fenil; cloranfenicol produzido por actinomiceto e possuindo na cadeia lateral radical derivado do ácido dicloroacético. Considerando em seguida os halometabolitos de fungos, traz à tona os nomes de griesofulvina, geodina, pannarina.

É lembrada com muita propriedade os cloro-sulfolipídeos em *Ochramonis danica*. Caminhando agora para as plantas africanas, descreve a ocorrência do ácido fluroacético enquanto é mostrada a participação de outro halogênio, o bromo, como derivado de terpenol (laurinterol) cujo composto é encontrado em algas vermelhas.

O autor, considerando suas experiências com organismos marinhos, apresenta observações assaz interessantes no que concerne à correlação existente entre as atividades antimicrobiana e a presença de halometabolitos.

Ao discutir a ocorrência de hidrocarbonetos halogenados pode-se aquilar o volume de produção desses compostos pelas algas que emanando dos oceanos vão atingir a camada da ozona da atmosfera.

Como consequência dessas observações, as questões surgidas estão relacionadas com o sistema enzimático: natureza da enzima, mecanismo de reação, produção de enzimas ao longo do período de crescimento e biologia molecular.

Thuioshi Ioneda
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Baltz, R.H. - Genetics and biochemistry of tylosin production: a model for genetic engineering in antibiotic-producing *Streptomyces*. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S. - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, vol.19, p.431-444, 1981.

O artigo é sem dúvida interessante, focalizando a atualidade da Engenharia Genética relacionada com a produção de antibióticos por *Streptomyces*. É discutida a grande potencialidade dessa técnica essencialmente pelo desenvolvimento nos anos recentes do processo de fusão de protoplastos e, da transformação do protoplasto e transinfecção.

Para o desenvolvimento do tema, foi escolhido o antibiótico tilosina, macrolídeo produzido comercialmente por *S. fradiae*. Considerado o núcleo da molécula, a tilactona - a estrutura e a sua biogênese a partir de intermediários da síntese de ácidos graxos, o passo seguinte é constituído de adição de unidades de micaminose, micinose e micarose e outras reações complementares para a mudança de funções.

Em razão das possibilidades de manipulação da estrutura da tilosina, são enormes as perspectivas de produção de grande número de derivados através da Engenharia Genética.

Thuioshi Ioneda
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Andersen, K. & Valentine, R.C. - Potential for genetic engineering of hydrogen bacteria. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S., eds. - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, vol.19, p.446-449, 1981.

A bactéria autotrófica *Alcaligenes eutrophus*, capaz de crescer tendo H₂ como substrato, é apresentada como um sistema de utilização de resíduos industriais, com a vantagem de não deixar sub-produtos poluentes. *A. eutrophus* acumula poli-β-hidroxibutirato que é um poliéster biodegradável e capaz de substituir o polipropileno. Além disto, *A. eutrophus* fixa CO₂ através do ciclo de Calvin. A característica da utilização de H₂ como fonte de energia e como redutor é devida a genes codificados por um plasmídio não conjugativo, porém capaz de sofrer mobilização por fatores R (por exemplo RP4). Também é relatada a transferência de gens cromossômicos por conjugação, bem como a transferência de gens de *Escherichia coli* para *A. eutrophus*. A manipulação genética desta bactéria está começando e seu futuro parece ser promissor.

Elisa G.C. Penido
Instituto de Microbiologia UFRJ
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

De 6 a 17 de dezembro de 1982, a SBM - Sociedade Brasileira de Microbiologia e o CLAMA - Comitê Latino Americano de Microbiologia Ambiental realizaram o I Simpósio Lationamericano de Produção de Biogás. Durante o evento, foram apresentadas conferências e comunicações a respeito de programas mantidos por agências governamentais e empresas atuantes na área de energia.

Com as dificuldades encontradas para editar textos, relativos às apresentações durante o evento, a SBM inicia a divulgação de informações fornecidas pelos autores, através da Revista de Microbiologia.

Os artigos não foram submetidos à revisão editorial, na forma adotada para as contribuições regularmente submetidas para publicação na Revista. Por razões operacionais, as matrizes não foram revistas pelos respectivos autores. Consequentemente, a editoração da Revista de Microbiologia antecipa o pedido de desculpas aos autores, pelos erros que vierem a ser introduzidos, inadvertidamente.

BIOCHEMISTRY AND MICROBIOLOGY OF ANAEROBIC DIGESTION

Robert E. Hungate

Department of Bacteriology
University of California
Davis California, USA

Introduction

Brasil is the fifth largest country in the world, with an area almost equal to that of Canada, China or the United States, but the plentiful moisture, warm temperature and tropical sunshine make its annual production of biomass probably greater than that of any other country in the world, including the much larger but colder United Socialist Soviet Republic. Brasil is already known over the world for its programs in developing renewable clean fuels, and it is most fitting that a Symposium on production of biogas from biomass should be held in Brasil. The organizers of the symposium are to be congratulated on their choice of topic.

I plan to approach the subject of anaerobic digestion from an historical viewpoint as a basis for a more detailed consideration of the microbiology and biochemistry.

The existence of natural gas, which is 95% methane, has been known to man for many years. Spontaneous ignition by phosphine of methane issuing from ponds or from cracks in the earth has probably been the basis for reports of Divine messages in the form of unexplained fires, flashes of light and ghostly illuminations. The occurrence of methane in the gas bubbles arising from swampy waters was demonstrated by Volta in 1776. In 1816 Magendie found methane in the large intestine of recently executed criminals, and in 1863 Reiset showed that it was produced in the stomach of ruminants.

Methane excited the interest of scientists when Pasteur demonstrated that microbes were the cause of fermentation and it was not long before microbiologists dreamed of exploiting the microbes for methane production. Cellulosic wastes were viewed as the material most available for production of large quantities of methane, and indeed the slow fermentation of cellulose by enrichment cultures often produced methane whereas alcohol and various acids were formed during the rapid fermentation of sugars and starches.

Until the 1940's scientists were thwarted in their attempts to obtain purified cultures of bacteria producing methane. With mixed cultures it was found that many organic substrates could be fermented to methane and carbon dioxide, but pure

cultures could not be obtained. In 1940 a 2-membered microbial culture was isolated by Barker and used to show that carbon dioxide could be reduced to methane, with the reducing power supplied by simultaneous removal of hydrogen from ethanol to form acetate. This was confirmed with isotopes of carbon which became available at about this time, and reduction of CO₂ was firmly established as a mechanism for production of methane.

At about the same time Buswell at Illinois, working with anaerobic biodigestors, used isotopes to show that methane arose also from the methyl group of acetate, with carbon dioxide formed from the carboxyl. Subsequent studies have confirmed the origin of methane from acetate and carbon dioxide in digester sludge, and measurements have shown that about two-thirds of the methane comes from acetate, the rest from CO₂, its reduction to methane being dependent on availability of hydrogen.

These findings eliminated the many other substrates that had previously been postulated for methanogens. However, with the subsequent isolation of pure cultures by Schnellen at Delft formate, methanol and carbon monoxide were added to the list of substrates used by methanogenic bacteria, and more recently Hippe & col. (1979) have shown that methylamines can be attacked, with the methyl groups forming the methane. However, these latter substrates are less commonly met than are acetate and H₂/CO₂.

During the period up to 1940 the chief contributions toward exploitation of methanogenic biodigestion were made by sanitary engineers. Anaerobic digestors of municipal sludge were constructed, and the methane produced supplied energy for the sewage disposal plant, with any excess fed into other uses. In subsequent years, with fossil fuel plentiful and cheap, oxidation of sewage through aeration became popular, and anaerobic digestion relatively less important. Now, with dwindling energy supplies, anaerobic biodigestion is again receiving much attention.

Fortunately, some modifications of concepts and anaerobic techniques for study of anaerobic microorganisms developed during the 1940's, and their implementation, coupled with new knowledge of biochemistry, has led to an almost explosive growth in our knowledge of the microbiology, biochemistry, and evolution of methanogenic bacteria.

The first new development in anaerobic microbiology was the recognition that there is no sharp dividing line between aerobiosis and anaerobiosis. Simple removal of oxygen does not insure growth of an anaerobe. It is necessary to provide reducing substances such as cysteine or sulfide in order to obtain the low redox potential of -0.3 volts or lower required by some anaerobes.

The second is the realization that ecological considerations must be observed in designing a culture medium. The medium must simulate the habitat conditions in which the organism lives in nature, or it must simulate a particular niche in that habitat (Hungate, 1962).

Thirdly the inoculum must be diluted quantitatively into a liquid decimal dilution series and, additionally, these various dilutions should be inoculated into tubes of melted agar culture medium which are immediately rolled in very cold water to solidify the agar on the wall of the culture tube as a thin layer in which colonies develop. This inoculation in the melted agar gives the anaerobic equivalent of a Petri dish pour plate. The agar separates the cells even better than is accomplished on a streak plate. The separation prevents most of the overgrowth that could occur in a liquid medium or on the surface of a streak plate. These features greatly improve the chances for development of bacteria of diverse types.

The fourth factor in the advance of modern anaerobic microbiology has been the recognition that many anaerobic bacteria must be protected at all times from exposure to oxygen. This has been accomplished by excluding air from the culture medium during its preparation, inoculation, incubation, examination and sampling. Gases completely freed of oxygen are used to displace and exclude air at all times.

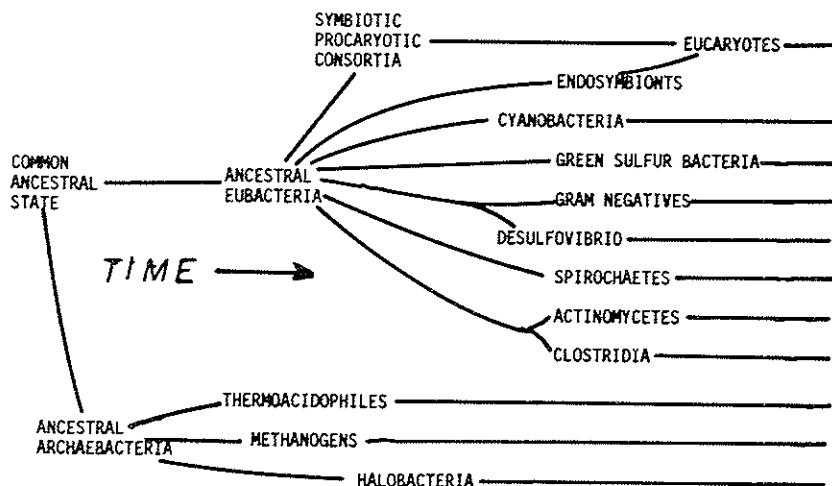
Observation of these stringently anaerobic procedures and use of anaerobic glove boxes have made possible the cultivation of pure methanogenic bacteria, as well as the maintenance of anaerobic conditions during biochemical manipulations. Even O₂ at a concentration of 10⁻³⁶ atmospheres is theoretically sufficient to inhibit growth of some anaerobes, and such a low concentration cannot be attained except by

addition to the medium of reducing materials such as cysteine or sulfide which chemically absorb out the last faint traces of oxygen and poised the potential of the system within their own redox range.

Adoption of these principles in many laboratories over the world has made possible the isolation in pure culture of some 30 to 40 strains of methanogenic bacteria now assigned to 22 species. There is little question that more will be discovered.

Availability of these pure cultures has permitted comparative studies of their 16S ribosomal ribonucleic acid (RNA) with that of many other organisms, both pro and eucaryotic. On the basis of the assumption that the ribosomal organization changes less rapidly than many other components of cells, differences in ribosomal RNA are postulated as disclosing very ancient evolutionary divergences. The methanogens, and a few halophilic and thermoacidophilic bacteria, have been found by Woese and his many collaborators (Fox & col., 1980) at Illinois and over the world to differ so much from other bacteria as to warrant their classification as a separate primitive kingdom, the Archaeabacteria. The archaeabacteria differ from the eubacteria not only in their RNA but also in their cell walls and lipids and in the unique methane fermentation. Some of the postulated new relationships are shown in Figure 1.

PROKARYOTIC EVOLUTIONARY RELATIONSHIPS (AFTER WOESE)



It is not surprising that methanogens are a very primitive group. Cosmologists believe that the earth was quite anaerobic at its beginning, and oxidation-reduction reactions to supply energy to the emerging life were limited chiefly to transferences of electrons between compounds containing the atoms carbon, hydrogen and oxygen.

The most reduced possible form of carbon was methane, and most oxidized was carbon dioxide. These symmetrical molecules were at a lower energy level anaerobically than any other oxidation states of carbon, and by converting the carbon in various compounds to CO_2 and CH_4 the living material could accomplish the greatest amount of work.

It is of interest that carbohydrates must also have appeared at a very early time. They are carbon compounds at an exactly intermediate state of oxidation and thereby are uniquely fitted to accomplish work in the absence of O_2 . This is evident from Figure 2 which shows the efficiency of the various oxidation states of carbon in providing energy under anaerobic conditions.

On the basis of their production of methane, the methanogenic bacteria are grouped together and assigned to several orders as in Figure 3. Some species are in Figure 4.

The substrates used by the various species are shown in Figure 5. It is apparent that methanogens can use relatively few materials as food. Their foods presumably represent some of the compounds primitively on Earth that are still produced. None of them resemble the materials in the bodies of plants; yet plant materials constitute the bulk of the renewable energy resources from which we hope to produce methane. Obviously the methanogens cannot alone convert plant substance to methane; they must be assisted by the myriads of microbes breaking down the bodies of plants composed chiefly of cell walls consisting largely of insoluble carbohydrate polymers together with lignin.

Figure 3

Classification of Methanogenic Bacteria

Methanobacteriales

Methanobacteriaceae

Methanobacteriumbryantii, thermoautotrophicum, formicicumMethanobrevibacterruminantium, arboriphilus, smithii

Methanothermaceae

Methanothermus fervidus

Methanococcales

Methanococcaceae

Methanococcusyannielii, voltae, mazéi, maripaludis, thermolithotrophicus

Methanomicrobiales

Methanomicrobiaceae

Methanomicrobium mobileMethanogeniumcariaci, marisnigri, thermophilicum

Methanosarcinaceae

Methanosarcina barkeriMethanothrix soehngenii

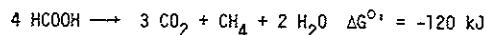
Methanoplanales

Methanoplanaceae

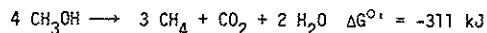
Methanoplanus limicolaUnclassified: Methanolobus tindarius, Methanoplasma elizabethii

Figure 2

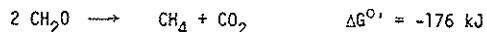
Why Carbohydrates?



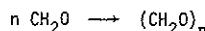
184 daltons 0.65 kJ/dalton



128 d 2.43 kJ/d



60 d 2.93 kJ/d

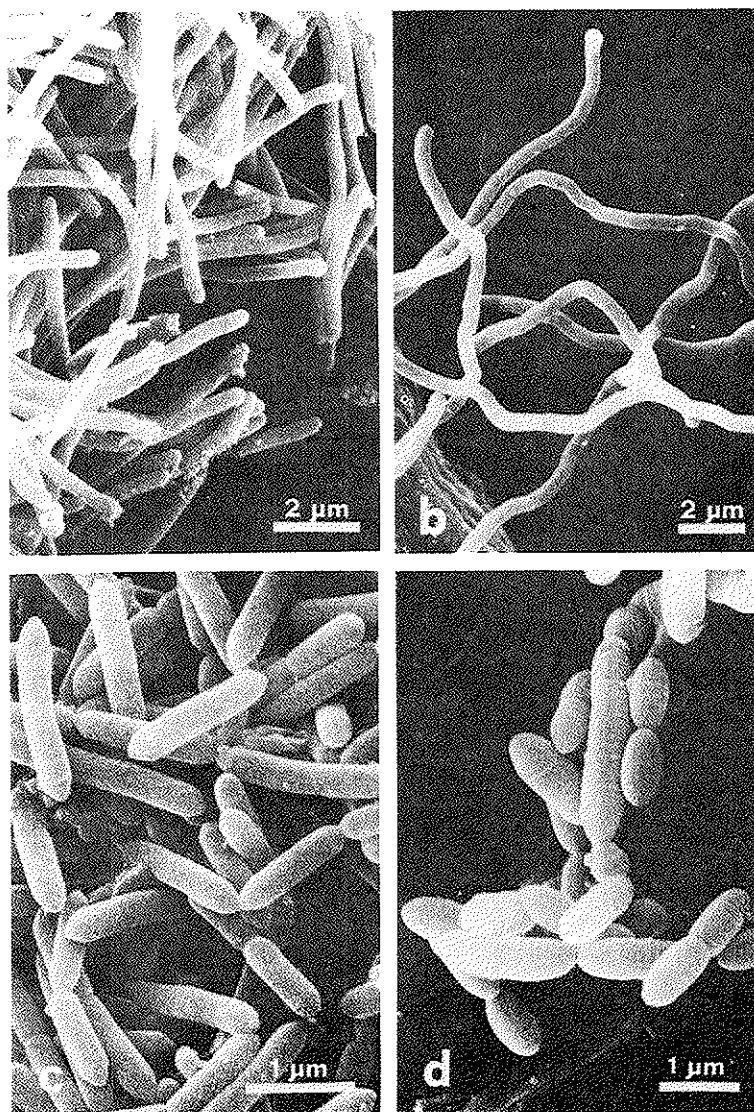


soluble → insoluble, no concentration effect

The chief fermentable material in plants is carbohydrate. Its anaerobic conversion to methane and its aerobic oxidation can be summarized in the equations shown in Figure 6. This comparison shows that the methane contains about 85% of the total energy in the carbohydrate available on its complete oxidation to carbon dioxide and water.

Figure 4 - Scanning electron photomicrographs of methane bacteria (by permission of Elsevier Biomedical Press B.V., from Zehnder & col. - The microbiology of methane bacteria, Second International Symposium on Anaerobic Digestion. Travemunde, Germany, 1981).

Symbols: a = *Methanobacterium formicicum*; b = *M. bryantii*; c = *Methanobrevibacter arboriphilus*; d = *Methanobrevibacter amithii* (cont.)



Although at first sight the aerobic and anaerobic decomposition of carbohydrates seem quite different, most of the reactions in aerobic breakdown are anaerobic, as is evident from examination of the initial steps in the conversion of glucose to acetate, carbon dioxide and hydrogen (Fig. 7). The chemical steps involved are dehydrogenation, hydration, dehydration, and decarboxylation.

Aerobically the hydrogen atoms in carbohydrate are combined with oxygen whereas anaerobically hydrogens from carbons 2, 3, 4 and 5 reduce carbon 1 and 6 to the methyl group of acetate and reduce CO_2 to methane while oxidizing carbons 2 and 5 to the carboxyl group, and carbons 3 and 4 to carbon dioxide.

Figure 4 (continued)

Symbols: e = *Methanococcus vannielii*; f = *Methanococcus voltae*; g = *Methanogenium marisnigri*; h = *Methanospirillum hungatei*

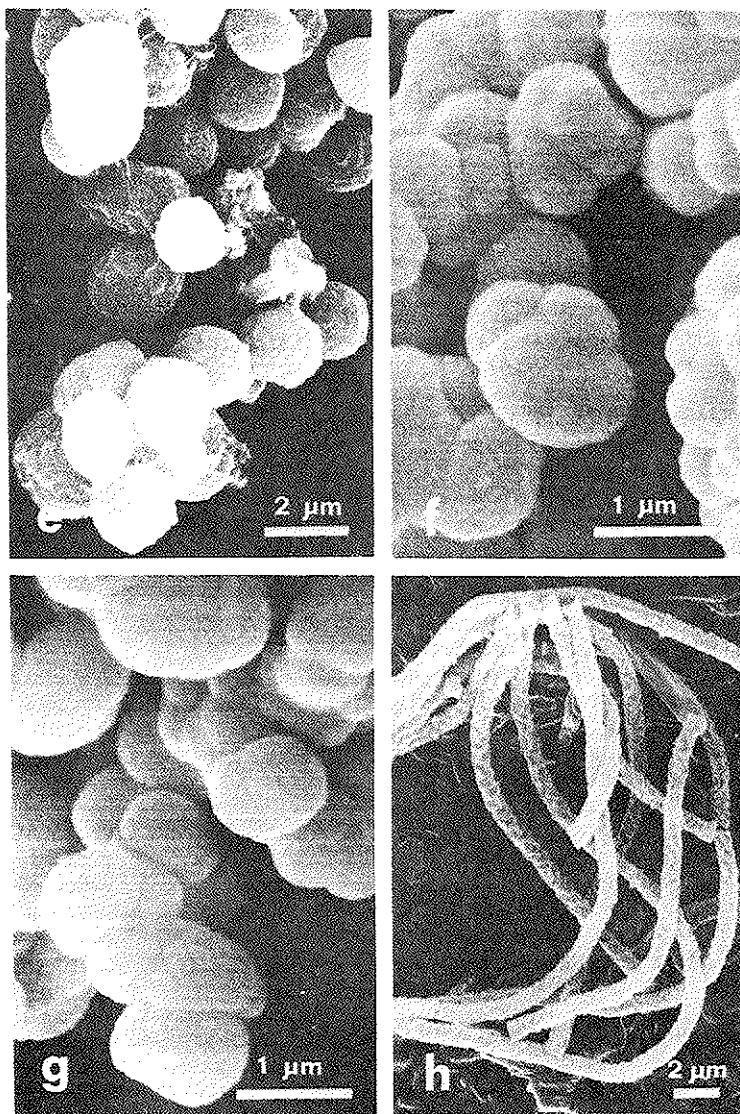
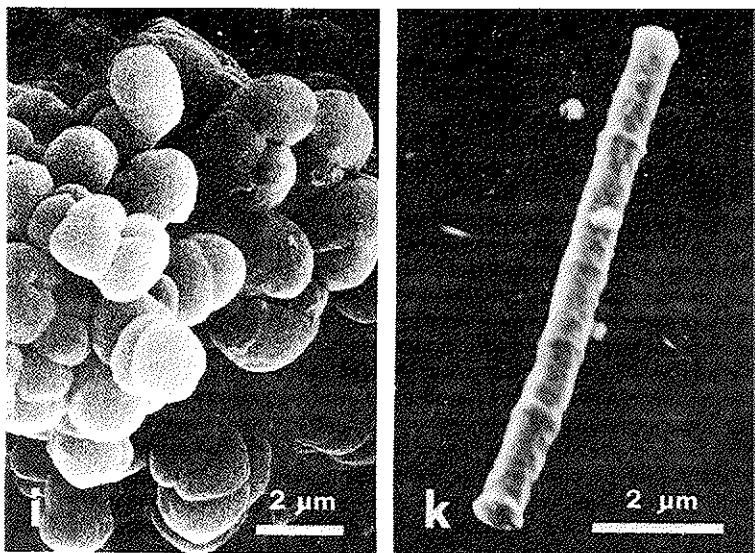


Figure 4 (continued)

Symbols: i = *Methanosarcina barkeri*; k = *Methanothrix soehngenii*



Under aerobic conditions, the acetate produced is this initial breakdown of the carbohydrate is not directly oxidized to CO_2 . Rather, it is condensed with oxaloacetate and only after becoming part of the citric acid cycle is it completely converted to carbon dioxide by various anaerobic steps of dehydrogenation, hydration, dehydration and decarboxylation. A big difference between aerobes and methanogens is that although methanogens utilize many steps of the citric acid cycle for formation of amino acids they cannot use it for oxidation of acetate because too little energy is available to drive so many reactions. The methanogens split the acetate directly into methane and carbon dioxide, and in some way manage to conserve part of the available energy as ATP which can be used to do the work of the cell.

This split of acetate is a key reaction in the anaerobic breakdown of plant cell wall material. Two of the three molecules derived from a carbohydrate are formed from acetate as compared to only one from reduction of carbon dioxide. In order to accomplish methanogenesis from acetate a few methanogenic bacteria have developed a unique acetate-splitting enzyme system. In view of the quantities of the acetate split to methane and CO_2 in nature it is rather surprising that thus far only 3 or 4 species have been shown to ferment acetate, as compared to about 16 species which can use H_2/CO_2 but not acetate (Figure 5).

But all the methanogens, regardless of substrate, possess in common the ability to reduce methyl groups to methane, generating ATP for use in cell growth and other reactions. When acetate, methanol or methylamine is the substrate the methyl group is reduced directly. When CO_2 or formate is the substrate it must first be reduced to the methyl stage. Both carbon monoxide and formate can provide the necessary hydrogen for reducing carbon dioxide to methane. Carbon monoxide is first reacted with water to form H_2 and CO_2 . Formate may also be converted by a hydrogenlyase reaction to CO_2 and H_2 . When CO_2 is the substrate H_2 must be given in the ratio of 4 H_2 to one CO_2 .

The four steps in the reduction of CO_2 and CH_4 each involve two electrons and involve quite different energy relationships, as may be seen in Fig. 8. Comparison shows that the 2-electron step in reduction of methanol to methane yields most of the energy. It is much greater than in 31 kJ available in the split of acetate to

methane, in part because acetate conversion involves a single electron which is transferred from one part of the acetate molecule to another. Although all the methanogens catalyze the reduction of the methyl group to methane, the energies are not the same from all the substrates, as can be seen from Fig. 9.

Figure 5

Substrates Used by Methanogenic Bacteria

Acetate: barkeri, mazéi, soehngenii

Carbon monoxide: barkeri, thermoautotrophicum

Formate: formicum, ruminantium, smithii, vannielii, voltae, mobile,
thermolithotrophicus, cariaci, marisnigri, thermophilicum,
hungatei, soehngenii, limicola

H_2 / CO_2 : bryantii, thermoautotrophicum, formicum, ruminantium, smithii,
arboriphilus, vannielii, voltae, maripaludis, mazéi, thermophilicum,
thermolithotrophicus, mobile, cariaci, marisnigri, hungatei, barkeri
limicola, fervidus

Methanol: mazéi, barkeri, tindarius

Methylamines: barkeri, mazéi, tindarius

Cannot use H_2/CO_2 : Methanosarcina strain TM-1 and TM-10, Methanotherrix,
Methanolobus

These figures emphasize the special category of acetate in relation to the other substrates. This difference in the energy available is reflected in the yield of cells per mol of methane formed. The cell yields have been determined for *Methanosarcina barkeri* by Smith & Mah (1978) who found 2.1mg of cells (dry weight) produced per mol of methane from acetate, 5.1mg from methanol and 8.7mg from 80% $H_2/20\% CO_2$.

The biochemistry of the methanogenic bacteria is currently undergoing rapid development. It started when a growth factor for *Methanobacterium ruminantium* was found by Bryant & col. (1971) and identified by Taylor & Wolfe (1974). The factor is mercaptoethanesulfonic acid (Fig. 10) and is given the common name Co M. It can be methylated by methanol or methylamine, but not acetate, in exchange for the hydrogen of the -SH group. Shapiro & Wolfe (1980) have found this to be accomplished enzymatically.

Many of the further studies in the biochemistry of methanogenesis have used *Methanobacterium thermoautotrophicum* because of the rapidity of its growth and the consequent greater ease in obtaining large cell crops.

In early experiments cell-free extracts of *M. thermoautotrophicum* converted methyl-Co M to methane if hydrogen and ATP were provided. The ATP appeared to catalyze the reaction but was not used in stoichiometric amounts, and only small quantities of methane were formed before the reaction ceased. Then it was found that if carbon dioxide was added to the cell-free extract along with the H₂ and ATP there was a marked increase in the rate of methanogenesis and a good deal more methane was formed before the conversion ceased. It was then shown (Sauer & col., 1979) that cell membranes of *M. ruminantium* produced methane without addition of any ATP.

In the cell-free extracts, a material was found which fluoresced markedly at a wave length of 420nm. It was designated as a factor 420 or F420. It acts as an electron carrier in oxidation-reduction reactions, and can transfer electrons from hydrogenase to NADP reductase, formate dehydrogenases and pyruvate and

α -ketoglutarate dehydrogenases. It is found in all methanogens and appears to be concerned in some of the reactions in amino acid synthesis. It has been identified by Eirich, Vogels & Wolfe (1976) as a flavin derivative with the structure 8-hydroxy 5-deazaisoalloxazine (Fig. 10). It is not unique to methanogens, occurring also in *Streptomyces*.

Figure 6

Overall Conversions under Aerobic and Anaerobic Conditions		
$C_6H_{12}O_6 + 6 O_2 \rightarrow 6 CO_2 + 6 H_2O$	$\Delta G^{\circ} = -2650 \text{ kJ}$	
$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 3 CO_2 + 3 CH_4$	$\Delta G^{\circ} = -393 \text{ kJ}$	
$3 CH_4 + 6 O_2 \rightarrow 3 CO_2 + 6 H_2O$	$\Delta G^{\circ} = -2255 \text{ kJ}$	
$\frac{2255}{2650} = 85\% \text{ of energy conserved as } CH_4$		

Figure 7

Breakdown of Carbohydrate to Acetate	
glucose + 2 ATP	\rightarrow fructose diphosphate
fructose diphosphate	\rightarrow 2 glyceraldehyde phosphate
2 glyceraldehyde phosphate + 2 H ₂ O	\rightarrow 2 1,3-diphosphoglycerate + 4 H
2 1,3-diphosphoglycerate	\rightarrow 2 3-phosphoglycerate + 2 ATP
2 3-phosphoglycerate	\rightarrow 2 2-phosphoglycerate
2 2-phosphoglycerate	\rightarrow 2 2-phosphoenolpyruvate + 2 H ₂ O
2 2-phosphoenolpyruvate	\rightarrow 2 pyruvate + 2 ATP
2 pyruvate + 2 H ₂ O	\rightarrow 2 acetate + 2 CO ₂ + 2 ATP + 4 H
glucose + 2 H ₂ O	\rightarrow 2 acetate + 2 CO ₂ + 8 H + 4 ATP
Aerobically: 8 H + 2 O ₂ \rightarrow 4 H ₂ O	
Anaerobically: 8 H + CO ₂ \rightarrow CH ₄ + 2 H ₂ O	

Gunsalus & Wolfe (1978) separated out two colored compounds from the cell-free methanogenic extract, one fluorescing brilliantly blue at 342nm and therefore designated F342. The other was a yellow nonfluorescent compound absorbing strongly at 430nm.

Daniels & Zeikus (1978) approached the biochemical problem somewhat differently. They pulse-labelled actively methanogenic cells with ¹⁴CO₂ for very short intervals of time. Among the earliest compounds taking up label was a strongly fluorescent yellow compound. This was examined further by Keltjens & Vogels (1981) who have identified the yellow fluorescent compounds as carboxydihydromethanopterin. It exhibits a brilliant bluegreen fluorescence at 342nm, and is identical with the F342 of Gunsalus & Wolfe. The methanopterin can be reduced to dihydromethanopterin which is also brilliantly blue fluorescent and can bind carbon dioxide (Fig. 11). Addition of carboxydihydromethanopterin to cell-free extracts plus H₂ causes production of a stoichiometric amount of methane without addition of any ATP.

The yellow non-fluorescent compound absorbing at 430nm was under study by Thauer's group in Germany (Thauer, 1982). They were interested because it was a cofactor in carbon monoxide dehydrogenase activity in bacteria synthesizing acetic acid from H₂ and CO₂. These organisms had been variously described as requiring molybdenum, tungsten and other heavy metals, but interest centered on nickel when it was noted that better growth of the acetogenic bacteria was obtained when a stainless steel instrument was used in preparing the medium. Nickel met the heavy metal requirement, and studies of the synthesis of F430 showed that it was a tetrapyrrole with one atom of nickel per molecule.

This nickel corrinoid compound is a component of all bacteria capable of synthesizing acetate from H₂ and CO₂. It is a cofactor in carbon monoxide dehydrogenase activity. Hu, Drake & Wood (1982) have shown that this enzyme catalyzes the reaction of carbon monoxide with methyltetrahydrofolate plus coenzyme A, forming acetyl CoA and tetrahydrofolate. Thauer (1981) has identified factor 430 as the prosthetic group also in the methyl CoM reductase of methanogenic bacteria. It gives the enzyme its yellow color.

Three of the important components in the cell-free extract of *Methanobacterium thermoautotrophicum*, originally called factors A, B and C, and all necessary for methane production, have now been identified. Component A is a hydrogenase catalyzing the transfer of hydrogen to factor 420, the deazaflavin, which in turn can provide hydrogen to NADH and to the various enzymes concerned with biosynthesis

of proteins. Brown & Ferry (1980) have demonstrated that a hydrogenase reacting with deazaflavin is membrane bound.

Figure 8

2-electron Steps in CO_2 Reduction to Methane

$\text{CO}_2 + \text{H}_2 \longrightarrow \text{CO} + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G^{\circ} = + 11.7 \text{ kJ}$
$\text{CO} + \text{H}_2 \longrightarrow \text{HCHO}$	$\Delta G^{\circ} = + 6.6 \text{ kJ}$
$\text{HCHO} + \text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_3\text{OH}$	$\Delta G^{\circ} = - 44.8 \text{ kJ}$
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G^{\circ} = - 112.5 \text{ kJ}$

Factor B is dihydromethanopterin. A membrane-bound form picks up the carbon dioxide. Factor C is the methyl-CoM-reductase containing the nickel tetra pyrrole. It is an enzyme of 300,000 molecular weight. Ellefson & Wolfe (1981) have demonstrated that it contains three different subunits of molecular weights 68,000, 45,000 and 38,500 d, respectively. Two units of each of these are joined to form the large functional enzyme. It has been shown immunologically to occur in all of five other tested species, though the enzyme in *M. ruminantium* and *M. marisnigri* different somewhat from that in *M. formicicum*, *M. bryantii* and *M. hungatei*.

Under standard conditions no energy is available in the reduction of carbon dioxide to the formaldehyde level (Fig. 8), i.e. the equilibrium is slightly towards the reactants rather than the products. But in reactions from formaldehyde to methane with 44.6 and 112.5 kJ of energy available, the equilibrium is strongly in the direction of methane. Thus, by linking all four reduction steps the conversion of carbon dioxide through the formaldehyde stage becomes energetically possible, with sufficient excess for production of ATP. Escalante-Semerana & Wolfe (1982) have shown that formaldehyde and its Co-M equivalent, hydroxymethyl-S-CoM, can be reduced by the cell-free extract, both at the same rate, and both stimulated by methanopterin. Since nickel is concerned in the metabolism of carbon monoxide in acetate formation, it seems possible that the Ni tetrapyrrole is concerned in the reduction of the carboxydihydromethanopterin to the formaldehyde.

The mechanism for production of ATP with the energy available in methane formation has not been definitely established. The existence of hydrogenase in a membrane, the fact that reduced methanopterin is bound in some way, and the occurrence of the nickel enzyme as part of the very large methyl CoM reductase enzyme complex all suggest that the spatial relationships (topography) of the several components are important. Membranes may be concerned. Jarrell & Sprott (1981) have found a transmembrane potential of 133mV in *Methanobacterium thermoautotrophicum*, with the internal side negative. In *Methanospirillum hungatei* the potential was 80mV. These investigators (1982) have further demonstrated that nickel can be transported into *Methanobacterium bryantii* against a concentration gradient and that there is an accompanying movement of protons. Doddema & col. (1980) have synthesized ATP with membrane vesicles of *M. thermoautotrophicum* supplied with hydrogen and CO_2 . Mountfort (1978) obtained synthesis of ATP in *Methanosarcina barkeri* when the external pH was rapidly shifted from 8.2 to 2.5,

Figure 9

Energies Involved in Methanogenesis (from Zehnder, 1982)

Reaction	$\Delta G^{\circ}, \text{kJ/CH}_4$
$4 \text{H}_2 + \text{CO}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-138.1
$4 \text{HCOO}^- + 2 \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{HCO}_3^-$	-126.8
$\text{HCOO}^- + 3 \text{H}_2 + \text{H}^+ \longrightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-134.3
$4 \text{CO} + 2 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2$	-185.1
$4 \text{CH}_3\text{OH} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{H}_2\text{O}$	-102.5
$\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2 \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{H}_2\text{O}$	-121.1
$4 \text{CH}_3\text{NH}_2 + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}^+ \longrightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4^+$	-101.6
$2 (\text{CH}_3)_2\text{NH} + 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{H}^+ \longrightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{NH}_4^+$	-86.3
$4 (\text{CH}_3)_3\text{N} + 6 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{H}^+ \longrightarrow 9 \text{CH}_4 + 3 \text{CO}_2 + 4 \text{NH}_4^+$	-80.2
$2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2 + 2 \text{H}_2\text{O} \longrightarrow 3 \text{CH}_4 + \text{CO}_2 + 2 \text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$	-70.0
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	-31.0

and the increase in ATP could be prevented by inhibitors of proton conduction and of magnesium ATPase.

Electron transport phosphorylation seems essential as a mechanism for generating ATP from the split of acetate to methane and carbon dioxide. This reaction does not provide enough energy for stoichiometric synthesis of ATP. Membrane phosphorylation can accomplish its non-stoichiometric formation. It may be pertinent in this connection that Kuhn & col. (1979) have found cytochrome b in cells of *Methanosarcina barkeri* but not in the other methanogens examined.

From Fig. 5 showing the substrate preference of the various species of methanogenic bacteria, it is evident that they do not all have exactly the same machinery for methane production. Many cannot use acetate, a few cannot use hydrogen, at least one is inhibited by hydrogen, and a number of them cannot grow on methanol or methylamines. Each must possess its own characteristic arrangement of catalysts, and it will be most interesting to learn how they are all related to the basic reduction of methyl groups to methane.

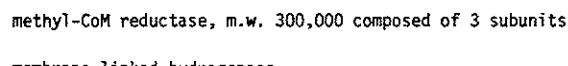
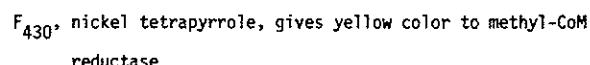
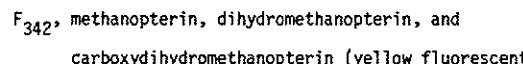
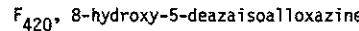
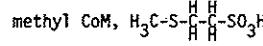
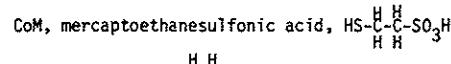
Evidence of metabolic control over the various enzymes is provided by studies of Mah & associates (1978) on their strain of *Methanosarcina barkeri*. They isolated it on a purely mineral medium with acetate as the only organic constituent of the medium, and maintained it by subcultures on acetate. When transferred to methanol or H₂/CO₂ it grew much faster, but after growth on these substrates it did not utilize acetate when returned to the stock medium. Later it was found at Illinois that acetate might again be metabolized, but only after a month of incubation with acetate. Apparently the reverse adaptation to acetate does not readily occur.

Zinder (1982) has studied acetate and methanol utilization in *Methanosarcina* TM-1, a thermophil that cannot utilize H₂/CO₂ and for which H₂ is inhibitory. This organism produced methane from methanol at a rate of 35 µmol/hr/mg protein when cells grown on methanol were used. Methane was produced from acetate by these cells at a rate of only 1.2, but when both methanol and acetate were provided the rate of methane production increased to 57 µmol/hr/mg protein. Tracers showed that on the mixed substrate the acetate was oxidized to provide hydrogen for cell synthesis and methanol was completely converted into methane. Similar results have been obtained with a mesophilic *Methanosarcina* which can use hydrogen.

Another feature of *Methanosarcina barkeri* was found by Mah and his colleagues when its isolation from the enrichment medium in pure acetate was undertaken. Even though acetate was the only organic material in the medium and *M. barkeri* was the only bacterium in the culture able to live on the acetate, still the number of non-methanogen colony-forming units far exceeded the number of methanogens as determined by

Figure 10

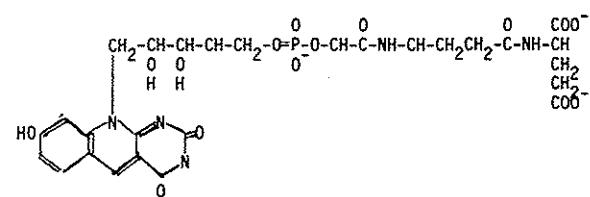
Enzymes and Coenzymes Concerned in Methanogenesis



membrane-linked hydrogenase

membrane-linked hydrogenase

Figure 11 - The structure of F₄₂₀



culture counts. *Methanosarcina* grew in large aggregates, and its total protoplasm may have been considerably greater than that of the accompanying species.

The contaminants were of at least three sorts and were easily cultured on complex organic medium. The nutritional requirements of one of them were studied by Ward & col. (1978) who found that certain amino acids, a peptide, a purine base, vitamin B12 and some other B vitamins were required, and glucose, mannitol, starch, pyruvate and five individual amino acids stimulated growth and hydrogen production. Apparently amino acids, a peptide, a purine and the required vitamins leaked out of the *Methanosarcina* during growth on acetate, in amounts sufficient to support an appreciable commensal population.

The methanogenic bacteria are essential for the growth of many non-methanogenic bacteria which depend on methanogens to scavenge hydrogen.

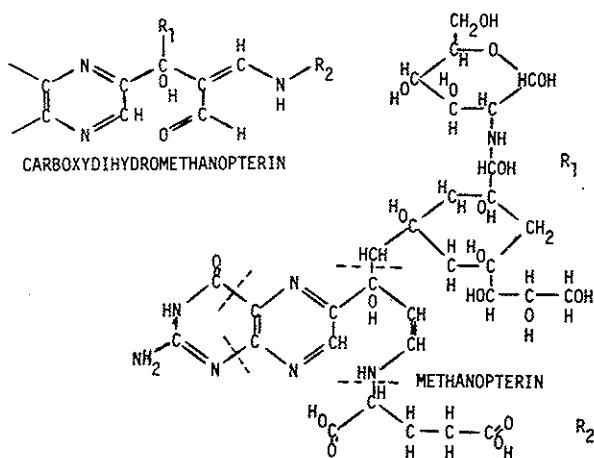
Acetate is not the only organic product of carbohydrate breakdown, though it is very important one.

Appreciable quantities of propionate and butyrate are also formed. They have been shown by Jeris & McCarty at Stanford (1965) to be broken down to methane and CO₂ by the mixed population in biodigestors. The fact that in the overall fermentation of carbohydrate acetate accounts for two-thirds of the methane formed means that the propionate and butyrate must be oxidized to acetate, with the removed hydrogen used to reduce CO₂ to methane, but until recently organisms capable of carrying out this oxidation under anaerobic conditions had not been discovered. Under standard conditions the oxidation of propionate and butyrate by removal of H₂ is endergonic, i.e. the reaction will proceed in the direction of reduction. For propionate the standard free energy change, ΔG°¹ is +76 kJ/mol, for butyrate it is +48 kJ/mol.

Although the energy relationships under standard conditions are unfavorable for oxidizing these acids by removal of hydrogen, the conditions in the biodigester are not standard. If the concentration of H₂ can be kept sufficiently low and the concentration of propionate and butyrate sufficiently high, a net oxidation can occur. Calculations based on theory indicate that at a concentration of less than 10⁻⁴ atmospheres of H₂ butyrate can be oxidized anaerobically by removal of hydrogen, and, if the H₂ concentration is maintained at an even lower concentration, propionate can be similarly oxidized. A number of the methanogens have such a high affinity for H₂ that they can keep its concentration below these levels and can obtain enough hydrogen to support growth even at the very low pressures. Thus propionate and butyrate forming in the carbohydrate fermentation can be oxidized anaerobically, though quite slowly because of the very small amount of energy available to the organism producing H₂ and to the one using it. The organisms oxidizing these organic compounds anaerobically are called "obligate proton reducers" because presumably all the electrons they remove from the substrate are combined with hydrogen ions (i.e. protons) in the medium to form hydrogen.

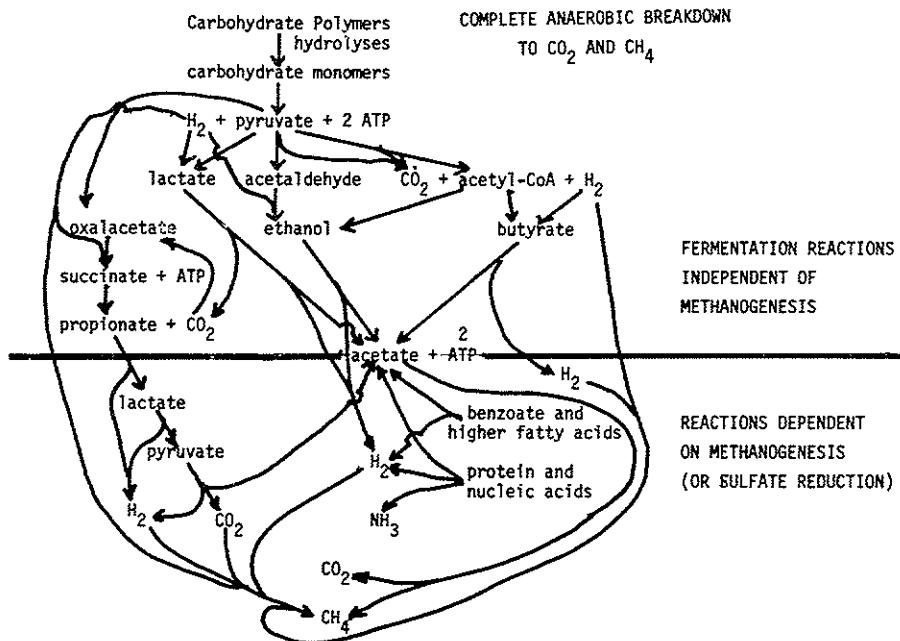
The proton reducers have proven very refractory to isolation in pure culture. It is difficult to remove H₂ efficiently enough by mechanical means to maintain its concentration below the limiting level. But by inoculating them together with a methanogen or a sulfate reducer that scavenges hydrogen they have been cultured and identified. Thus Boone & Bryant (1980) have grown a bacterium oxidizing propionate

Figure 12 - The structure of methanopterin and carboxydihydromethanopterin



in coculture with *Desulfovibrio*. In this case the propionate hydrogen is oxidized with sulfate and other sulfur compounds instead of methane. Actually there is a little more energy available when sulfate is the oxidant, and the hydrogen concentration does not have to be kept quite as low as when CO_2 is the oxidant and methane is formed. They have given the name *Syntrophobacter wolinii* to the propionate oxidizer, and have obtained methane in coculture with *Methanospirillum hungatei* on a medium containing no sulfate.

Figure 13 – Diagram to show the relationship of methanogenesis to other fermentation processes



In similar fashion McInerney & col. (1981) have isolated *Syntrophomonas wolffii* which oxidizes butyrate anaerobically in combination with either *Methanospirillum* or *Desulfovibrio*. Also Mountfort & Bryant (personal communication) have obtained a coculture of benzoate oxidizer that with *Desulfovibrio* will completely convert benzoate to methane and H₂S. In a sulfate-free medium with *Methanospirillum* methane is formed but it was not possible to free the mixture of all *Desulfovibrio* cells.

These examples show how the combined actions of bacteria in an open system participate in various phases of the anaerobic oxidation by which the photosynthetic products of plants can be converted to methane and carbon dioxide (Fig. 12). Whether or not this potential for production of methane can be exploited to reduce our use of fossil fuels remains to be seen. But we can be sure that the more complete is our knowledge of their microbiology and biochemistry the better we will be in a position to exploit the methanogens.

References

1. Baresi, L.; Mah, R.A.; Ward, D.M. & Kaplan, I.R. – Methanogenesis from acetate enrichment studies. *Appl. Environm. Microbiology*, 36:186-197, 1978.

2. Barker, H.A. - Studies on the methane fermentation IV - The isolation and culture of *Methanobacterium omelianskii*. *Antonie van Leeuwenhoek* 6:201-220, 1940.
3. Boone, D.R. & Bryant, M.P. - Propionate-degrading bacterium *Syntrophobacter wolinii* (sp.nov., gen.nov.) from methanogenic ecosystems. *Appl. Environm. Microbiol.*, 40:626-632, 1980.
4. Brown, D.P. & Ferry, J.G. - Resolution of coenzyme F420 and methyl viologen-linked hydrogenase from *Methanobacterium formicicum* strain JF-1. Abst. K 33, 80th Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol., p.132, 1980.
5. Bryant, M.P.; Tzeng, S.F.; Robinson, I.M. & Joyner, A.E. - Nutrient requirements of methanogenic bacteria. *Adv. Chem. Series*, 105:23-40, 1971.
6. Buswell, A.M. & Sollo, F.W. - The mechanism of the methane fermentation. *J. Amer. Chem. Soc.*, 70:1778- 1780, 1948.
7. Daniels, L. & Zeikus, J.G. - One-carbon metabolism in methanogenic bacteria: analysis of short-term fixation products of $^{14}\text{CO}_2$ and $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ incorporated into whole cells. *J. Bacteriol.*, 136:75-84, 1978.
8. Doddema, H.J.; Cleason, C.A.; Kell, D.B.; van der Drift, C. & Vogels, G.D. - An adenosine nucleotide translocase in the prokaryote *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 95:1288-1293, 1980.
9. Birich, L.D.; Vogels, G.D. & Wolfe, R.S. - Proposed structure for coenzyme F420 from *Methanobacterium*. *Biochemistry*, 17:4583-4593, 1978.
10. Ellefson, W.L. & Wolfe, R.S. - Compound C of the methylreductase system of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biol. Chem.*, 256:4259-4262, 1981.
11. Escalante-Semerena, J.C. & Wolfe, R.S. - Conversion of formaldehyde to methane by cell extracts of *Methanobacterium*. Abst. Annual Meeting Amer. Soc. Microbiol., p.109, 1982.
12. Fox, G.E.; Stackebrandt, E.; Hespell, R.B.; Gibson, J.; Maniloff, J.; Dyer, T.A.; Wolfe, R.S.; Balch, W.E.; Tanner, R.S.; Mangrum, L.J.; Zablen, L.B.; Blakemore, R.; Gupta, R.; Bonen, L.; Lewis, B.J.; Stahl, D.A.; Luehrsen, K.R.; Chen, K.N. & Woese, C.R. - The phylogeny of prokaryotes. *Science*, 209:457-463, 1980.
13. Gunsalus, R.P. & Wolfe, R.S. - Chromophore factors F₃₄₂ and F₄₃₀ of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 3:191-193, 1978.
14. Hippe, H.; Caspari, D.; Fiebig, K. & Gottschalk, G. - Utilization of trimethylamine and other N-methyl compounds for growth and methane formation by *Methanosarcina barkeri*. *Proc. Nat. Acad. Sci., U.S.A.*, 76:494-498, 1979.
15. Hu, S.H.; Drake, L. & Wood, H.G. - Synthesis of acetyl coenzyme A from carbon monoxide, methyltetrahydrofolate and coenzyme A by enzymes from *Clostridium thermoaceticum*. *J. Bacteriol.*, 149:440-448, 1982.
16. Hungate, R.E. - Ecology of bacteria. In: - Gunsalus & Stanier, eds. - *The bacteria*. New York, Academic Press, chap. 3, vol. IV, 1962.
17. Jeris, J.S. & McCarty, P.L. - Biochemistry of methane fermentation using ^{14}C tracers. *J. Water Pollution Control Federation*, 37:178-192, 1965.
18. Jarrel, K.F. & Sprott, G.D. - The transmembrane electrical potential and extracellular pH in methanogenic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 27:720-728, 1981.
19. Jarrel, K.F. & Sprott, G.D. - Nickel transport in *Methanobacterium bryantii*. *J. Bacteriol.*, 151:1195-1203, 1982.
20. Keltjens, J.T. & Vogels, G.D. - Novel coenzymes of methanogens. In: - Dalton, H., ed. - *3rd Intern. Symp. Microbial Growth on C₁-compounds*. London, Hyden and Son, p.152-158, 1981.
21. Kuhn, W.; Fiebig, K.; Walther, R. & Gottschalk, G. - Presence of a cytochrome b₅₅₉ in *Methanosarcina barkeri*. *FEBS Lett.*, 105:271-274, 1979.
22. Magendie, F. - Note sur les gaz intestinaux de l'homme sain. *Ann. Chim. Physique* 2, Ser., 2:292-297, 1816.
23. McInerney, M.J.; Bryant, M.P.; Hespell, R.B. & Costerton, J.W. - *Syntrophomonas wolfei*(gen. nov., sp. nov.), an anaerobic, syntrophic, fatty-acid-oxidizing bacterium. *Appl. Environm. Microbiol.*, 41:1029-1039, 1981.
24. Mountfort, D.O. - Evidence for ATP synthesis driven by a proton gradient in *Methanosarcina barkeri*. *Bioch. Biophys. Res. Comm.*, 85:1346-1352, 1978.

25. Reiset, J. - Recherches chimiques sur la respiration des animaux d'une ferme. Annal. Chim. Physique Ser. 3, 69:129-169, 1863.
26. Sauer, F.D.; Erfle, J.D. & Mahadevan, S. - Methane synthesis without the addition of adenosine triphosphate by cell membranes isolated from *Methanobacterium ruminantium*. Biochem. J., 178:165, 1979.
27. Schnellen, C.G.T.P. - Onderzoeken over de methaansturing. Dissertation, Delft, 1947.
28. Shapiro, S. & Wolfe, R.S. - Methyl-coenzyme M, an intermediate in methanogenic dissimilation of C₁ compounds by *Methanosarcina barkeri*. J. Bacteriol., 141:728-734, 1980.
29. Smith, M.R. & Mah, R.A. - Growth and methanogenesis by *Methanosarcina* strain 227 on acetate and methanol. Appl. Environm. Microbiol., 36:870-879, 1978.
30. Taylor, C.D. & Wolfe, R.S. - Structure and methylation of coenzyme M (HSCH₂CH₂SO₃). J. Biol. Chem., 249:4879-1885, 1974.
31. Thauer, R.K. - Nickel tetrapyrroles in methanogenic bacteria: structure, function and synthesis. In: - Hughes, D.E. & col., eds. - Anaerobic digestion. New York, Elsevier Biomedical Press, p.37, 1981.
32. Thauer, R.K. - Nickel tetrapyrroles in methanogenic bacteria: structure, function and biosynthesis. Zbl. Bakt. Hyg., 1 Abt. Orig. C, 3:265-270, 1982.
33. Ward, D.M.; Mah, R.A. & Kaplan, I.R. - Methanogenesis from acetate: a non-methanogenic bacterium from an acetate enrichment. Appl. Environm. Microbiol., 35:1185-1192, 1978.
34. Zehnder, A.J.B. - Microbiology of methane bacteria. In: - Hughes, D.E. & col., eds. - Anaerobic digestion. New York, Elsevier Biomedical Press, p.45-68, 1982.
35. Zinder, S.H. - Regulation of acetate and methanol metabolism in a thermophilic strain of *Methanosarcina*. Abst. Annual Meeting Amer. Soc. Microbiol., p.109, 1982.

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

VOLUME 15 JANEIRO-MARÇO 1984 NÚMERO 1

	CONTEÚDO	CONTENTS
Saxena, J.	1 Sistemas de testes "in vitro" para levantamento de mutagenicidade por produtos químicos ambientais	" <i>In vitro</i> " test systems for mutagenicity screening of environmental chemicals
Coelho, M. do S.L.; Guimarães, W.V.; Borges, A.C.; Silva, D.O. & Araújo, E.F. de	17 Sobrevivência de <i>Salmonella</i> em carne bovina moída armazenada em baixas temperaturas	<i>Survival of Salmonella in ground beef under low storage temperatures</i>
Oliveira, T. de J.G.	24 Adaptação de métodos clássicos de análise de penicilinas à cefazolina	<i>Adaptation of classic methods for penicillins analysis to cephazoline</i>
Fava Netto, C.; Schalch, A.L de & Arruda, C.	27 Durabilidade do antígeno polissacarídeo de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	<i>Viability of the polysaccharide antigen of P. brasiliensis</i>
Martinez, M.B. & Moura, R.A. de A.	33 <i>Yersinia enterocolitica</i> em fezes de crianças com diarréia aguda	<i>Yersinia enterocolitica in children with acute diarrhoeae</i>
Benchetrit, L.C.; Avelino, C.C. & Oliveira, C.M. de	35 Sorotipos e hialuronidase extracelular em estreptococos do grupo A	<i>Serotypes and extracellular hyaluronidase of group A streptococci</i>
Informação Técnico-Científica SBM	39	

VOLUME 15 ABRIL-JUNHO 1984 NÚMERO 2

Durigon, Edison Luiz Mós, Eduardo do N. & Santos, Manoel Armando dos	41 Similaridade de resultados com diferentes métodos de coloração diferencial de viabilidade em <i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Similarity of the results with different staining methods in the viability of Mycobacterium bovis</i>
--	--	--

Barcellos, David Emilio S.N. de Oliveira, Sérgio J. de & Borowski, Sandra Maria	45	Classificação sorológica de amostras de <i>Erysipelothrix</i> <i>rhusiopathiae</i> , isoladas de suínos, no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil	Serologic classification of <i>Erysipelothrix</i> <i>rhusiopathiae</i> strains from pigs in the State of Rio Grande do Sul, Brazil
Plotkowski, Maria Cristina & Suassuna, Italo	48	Fenômeno de Dienes em <i>Proteus</i> : ausência de correlação com a estrutura antigenica e a produção de metabólitos difusíveis	Dienes phenomenon in <i>Proteus</i> : lack of correlation to antigenic structure and to production of diffusible metabolites
Ferreira, Maria das D. Pinto, Vera Lúcia L.T. & Hofer, Ernesto	54	Manipuladores de alimentos em restaurantes de Belo Horizonte, portadores de <i>Salmonella</i>	Food handlers as <i>Salmonella</i> carriers in restaurants of Belo Horizonte, Minas Gerais
Oliveira, Maria Cecília F.L. de & Kiyan, Choiti	60	Ação da difenilamina (DPA) sobre <i>Candida</i> <i>utilis</i> em condições proliferativas	The effects of diphenylamine on <i>Candida</i> <i>utilis</i> under proliferating conditions
Araujo, Janete Magali de Lyra, Francisco D. de A. & Kurylowicz, Włodzimierz	67	Recombinação em <i>Streptomyces</i> produtores de antibióticos por fusão de protoplastos	Recombination in antibiotic producing <i>Streptomyces</i> by protoplast fusion
Campos-Takaki, Galba Maria Takaki, Massanori Rios, Eugênio M. & Araújo, Janete Magali	82	Glucose isomerase de <i>Zymomonas mobilis</i>	Glucose isomerase from <i>Zymomonas mobilis</i>
Ferreira, Suely V. Servulo, Eliana F.C. Silva, Iracema M. da & Martelli, Hebe L.	86	Isolamento de bactérias produtoras de hidrogênio em biodigestores	Isolation of <i>H₂</i> -producing enterobacteria from biodigestors
França, Francisca P. de Castro, Angela Christina D. de & Leite, Selma G.F.	89	Desempenho de <i>Aspergillus niger</i> A1 na fermentação cítrica	Citric acid fermentation with <i>Aspergillus niger</i> A1
Martins, Maria Therezinha Alves, Maria Neusa Sanchez, Petra S. & Sato, Maria Inês Z.	94	Avaliação da relação coliformes fecais/estreptococos fecais na caracterização da poluição fecal em um rio subtropical	Evaluation of the fecal coliform/fecal streptococci ratio in the characterization of fecal pollution in a subtropical river

- Costa, I.; Martelli, H.L.; Silva, I.M. & Pomeroy, D.
- 109 Produção de carotenóides por fermentação. I - Produção de biomassa de *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*
- Carotenoid production by fermentation. I - Biomass production of Rhodotorula glutinis var. glutinis*
- Costa, S.O.P.; Bianco, M. & Bonato, M.C.M.
- 114 Sensibilidade de linhagens de *Proteus mirabilis* portadores de plasmídio R ao desoxicôlato de sódio
- Increased sensibility to sodium deoxycholate of Proteus mirabilis strains carrying plasmid R*
- Salgado, J.M. & Basso, L.C.
- 119 Caracterização de substâncias tóxicas produzidas por isolados do gênero *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* associados ao milho e arroz
- Mycotoxins associated with corn and rice produced by isolates of Aspergillus, Penicillium and Fusarium*
- Faro, H.M.; Maiorano, A.E. & Hiss, H.
- 123 Estudo comparativo entre *Trichoderma viride* e *Myrothecium verrucaria* na produção de enzimas celulolíticas
- Comparative study between Trichoderma viride and Myrothecium verrucaria for the production of cellulolytic enzymes*
- Baruffaldi, R.; Penna, T.C.V.; Schuch, R.; Gioielli, L.A.; Pitombo, R.N.M.; Machoshvili, I.A. & Abe, L.E.
- 127 Resistência térmica de esporos de *Bacillus stearothermophilus* FS 1518 em solução tampão fosfato M/15 (pH = 7,0)
- Thermal resistance of spores of Bacillus stearothermophilus FS 1518 in phosphate buffer M/15 (pH = 7.0)*
- Vancetto, M.D.C.; Lima, M.L.S.R.; Moura, E.R.G.; Santos, N.P. & Soerensen, B.
- 132 Aplicação do LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) para a detecção de pirogênio em soros hiperimunes. Estudo comparativo como o método tradicional em coelhos
- Application of the LAL (*Limulus Amebocyte Lysate*) for detection of pyrogen in hyperimmune serums. Comparative study with the traditional method in rabbits*
- Andrade, J.R.C.; Melo, F.M.; Dickie, L.; Rosa, M.R.S. & Suassuna, I.
- 137 Pili hemaglutinante manose-resistente em *Escherichia coli* isoladas de infecções do trato urinário
- Mannose-resistant hemagglutinins and pili in Escherichia coli associated to urinary tract infections*
- Teixeira, L.M.; Suassuna, I.R. & Suassuna, I.
- 140 Sorotipos de *Shigella* em gastroenterites no Rio de Janeiro
- Serotypes of Shigella isolated from cases of gastroenteritis in Rio de Janeiro*

Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Silva, N.T.C. & Almeida, C.R.	145 Informe sobre a peste bubônica (infecção por <i>Yersinia pestis</i>) no Estado de Minas Gerais, Brasil	Note on bubonic plague (<i>Yersinia pestis</i> infection) in Minas Gerais State, Brazil
Neitzert, E. & Waack, R.S.	147 Vacina antiaftosa por DNA recombinante (rDNA): estratégias para construção de vetores de expressão para o gene VP ₁	DNA recombinant foot and mouth disease vaccine: VP ₁ expression vectors strategies construction
Furlanetto, S.M.P.; Campos, M.L.C.; Hársi, C.M.; Buralli, G.M. & Ishihata, G.K.	170 Microrganismos enteropatogênicos em moscas africanas pertencentes ao gênero <i>Chrysomyia</i> (Diptera, Calliphoridae) no Brasil	Enteropathogenic microorganisms in flies belonging to the genus <i>Chrysomyia</i> (Diptera, Calliphoridae) in Brazil
Bellei, M.M.; Gareau, E.E.C.A.; Mezéncio, J.M.S. & Chagas, H.L.B.	175 A eficiência de audiovisuais no ensino de microbiologia	The effectiveness of visual aids in teaching a microbiology course
Informação Técnico-Científica SBM	183	

VOLUME 15 OUTUBRO-DEZEMBRO 1984 NÚMERO 4

Montelli, A.C.	193 Antibioticoterapia racional - contribuição da microbiologia clínica	Rational antibiotic therapy - contribution from clinical microbiology
Costa, S.O.P. da; Bianco, M. & Bonato, M.C.M.	202 Ação de alguns agentes curagênicos na perda da excreção de protease em <i>Proteus mirabilis</i>	Effects of some curing agents on the loss of protease excretion of <i>Proteus mirabilis</i>
Andrade, L.M. de; Batista, A. de M.; Camurati, C.; & Marsico, A.G.	209 Decréscimo da população bacteriana eliminada por pacientes com tuberculose pulmonar tratados com esquema de curta duração	Decrease of bacterial population of pulmonary tuberculous patients treated by short course chemotherapy
Antunes, G.S.; Damasceno, C.A.V. & Cisalpino, E.O.	217 Perfil de susceptibilidade de <i>Neisseria gonorrhoeae</i> a antimicrobianos em Belo Horizonte, MG	Pattern of susceptibility of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> against antimicrobials in Belo Horizonte area
Nunes, M.P.; Toledo, M.R.F. de; Trabulsi, L.R. & Ricciardi, I.D.	222 Invasibilidade e enterotoxigenicidade de <i>Yersinia enterocolitica</i> e das espécies atípicas de <i>Yersinia</i> isoladas do homem e de cães no Brasil	Invasion and enterotoxin production by <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> and atypical <i>Yersinia</i> isolated from humans and dogs in Brazil

Cauduro, P.F.; Mezzari, A. & Dias, C.A.G.	227 Conjuntivite por <i>Neisseria lactamica</i>	<i>Conjunctivitis due to Neisseria lactamica</i>
Teixeira, L.M.; Suassuna, I.R. & Suassuna, I.	231 Resistência a antimicrobianos em amostras de <i>Shigella</i> isoladas no Rio de Janeiro	<i>Antimicrobial susceptibility tests in Shigella strains isolated in Rio de Janeiro</i>
Andrade, J.R.C.; Caniné, G.A.; Parentoni, L.S. & Santa Rosa, M.R. de	239 Pili e aderência para células HeLa em <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas	<i>Pili and adherence to HeLa cells in enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC) from outbreaks cases of infantile enteritis</i>
Magalhães, F.M.M. & Döbereiner, J.	246 Ocorrência de <i>Azospirillum amazonense</i> em alguns ecossistemas da amazônia	<i>Occurrence of <i>Azospirillum amazonense</i> in some amazonian ecosystems</i>
Castro, R.	253 Estudio comparativo de las pruebas bioquímicas empleadas para la determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en alimentos	<i>Comparative study of the biochemical test used to determine <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> in foods</i>
Purchio, A.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Ugolini, C. & Remie, C.A.	258 Fungos anenófilos da Baixada Santista, Estado de São Paulo, Brasil	<i>Airborne fungi of Baixada Santista, State of São Paulo, Brazil</i>
Muro, M.A. de; Park, Y.K. & Carioca, J.O.B.	266 Produção de etanol a partir de farinha de babacu, através da fermentação alcoólica não convencional	<i>Production of ethanol from raw babassu starch by a nonconventional fermentation method</i>
Informação Técnico-Científica SBM	272	
Hungate, R.E.	278 Bioquímica e microbiologia da digestão anaeróbica	<i>Biochemistry and microbiology of anaerobic digestion</i>

[Impresso em offset]



Avenida Boopier, 64
Vila das Mercês São Paulo
Fone: 914-0233
CEP 04283

com times fornecidos pelo autor

