

Revista de Microbiologia

Regina



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 16 Número 1 Jan.-Mar. 1985

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho diretor.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Diretor Executivo da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Diretores da Revista.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual Biological Journals" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos geréticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviaturas bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de nanograma (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($m\mu$) micrônico ($\mu\mu$). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos 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 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ou microlitros por litro ($\mu\text{litos/litro}$). A Revista por si se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRÓORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergery'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 Bergery deverá ser mencionada entre parênteses, à primeira vez em que o nome figura no texto e no resumo.

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

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

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

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

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

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: Publ. Hith 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 perpendicularmente e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na seção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no cobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulados devem ser feitas em papel brillante, com contrastes adequados 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 Ciências Biomédicas USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 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
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: 2 ORTN's para o Brasil: US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) para o Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

Acquisition by non-members Annual subscription: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

Impressão Gráfica Editora Hamburg Ltda.

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

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria Presidente
Marcelo Magalhães
Universidade Federal de Pernambuco
Cidade Universitária
50000 Recife PE

Vice-Presidente
João Salvador Furtado
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo

Secretário Geral
Milton de Uzeda
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I — Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Tesoureiro
Walderex Gambale
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Dept.º de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 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
Dep. 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 16 JANEIRO-MARÇO 1985 NÚMERO 1
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 16(1)

CONTEÚDO

Sant'Anna, E.S.
& Aquarone, E.

Buck, N.;
Gambale, V.;
Cambale, W.
& Paula, C.R.

Madeira, E.D.;
Lima, F.W. de M.;
Faria, A.C. de;
Baldez, M.L.
& Campos Neto, A.

Gatti, M.S.V.;
Serafim, M.B.;
Castro, A.F.P. de;
Brito, J.R.F.
& Barcellos, D.E.S.N. de

Schocken-Iturrino, R.P.;
Ávila, F.A. de;
Pinesse, J.E.
& Yokoya, F.

Ogassawara, S.;
Benassi, S.;
Jamra, L.M.F.;
Leme, P.T.Z.
& Hagiwara, M.K.

Araújo, M.A. de;
Uthida-Tanaka, A.M.
& Castro, O.C.

Zbral, A.A.

1 Influência da água de maceração de milho no crescimento de *Candida utilis* em licor sulfítico

9 Microbiota fúngica anemófila da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil

15 Lise celular dependente de anticorpos de *Leishmania donovani* por células de sangue humano periférico

✓ 21 Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas para suínos isoladas no Brasil

31 Surto de botulismo C em frangos no Estado de São Paulo, Brasil

36 *Hammondia hammondi* nas fezes de gatos na cidade de São Paulo, Brasil

41 *Staphylococcus aureus*. II - Prevalência em portadores saúes e pacientes com conjuntivite estafilococica

46 Isolamento e caracterização de *Vibrio lactose-positivo*, de mexilhões da Baía da Guanabara, Estado do Rio de Janeiro

CONTENTS

Influence of corn steep liquor on growth of Candida utilis in spent sulfite liquor

Airborne fungi of Presidente Prudente SP, Brazil

Antibody-dependent cellular lysis of [³H]-labelled Leishmania donovani by human peripheral blood cells

Virulence factors present in strains of porcine enteropathogenic Escherichia coli isolated in Brazil

An outbreak of type C botulism in broiler chickens in São Paulo State, Brazil

Hammondia hammondi in the feces of cats in the city of São Paulo, Brazil

Staphylococcus aureus. II - Occurrence in healthy carriers and patients with staphylococcal conjunctivitis

Vibrio lactose-positive, from mussels of the Guanabara Bay, State of Rio de Janeiro

Franco, B.D.G.M.;
Guth, B.E.C.
& Trabulsi, L.R.

✓ 49

Isolamento e caracte-
ristica de cepas de
Escherichia coli ente-
ropatogênica isoladas
de alimentos

✓ *Isolation and
characteristic of
enteropathogenic
Escherichia coli strains
isolated from foods*

Berchieri Junior, A.;
Paulillo, A.C.;
Fernandes, S.A.;
Irino, K.
& Pessoa, G.V.A.

56 Teste de sensibilidade
de 139 cepas de 32
sorotipos, frente a 10
antimicrobianos

*Sensitivity to 10
antimicrobial agents was
tested with 139 strains
of *Salmonella*, belonging
to 32 serotypes,
isolated from meals of
animal source*

Rodrigues, L.G. de M.;
Whittington, W.
& Greaves, W.L.

61 Método simplificado para
o isolamento de
Chlamydia trachomatis
usando células em
suspensão

*Simplified method for
isolation of *Chlamydia
trachomatis* using cells
in suspension*

Nozawa, C.M.
& Apostolov, K.

66 Insaturação de ácidos
graxos C18 induzida pelo
vírus *Vaccinia* em
células vero

*Vaccinia virus-induced
unsaturation of C18
fatty acids in vero
cells*

Informação
Técnico-Científica SPM

70

La Iglesia, M.R. de

76 Apresentação dos novos
conceitos de
biodigestores para
diminuição do tempo de
retenção hidráulica

INFLUÊNCIA DA ÁGUA DE MACERAÇÃO DE MILHO NO CRESCIMENTO DE CANDIDA UTILIS EM LICOR SULFÍTICO

Ernani Sebastião Sant'Anna

Deptº de Ciéncia e Tecnologia de Alimentos
Centro de Ciéncias Agrárias
Universidade Federal de Santa Catarina
Caixa Postal 476
88000 Florianópolis SC, Brasil

& Eugênio Aguarone

Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacéutica
Faculdade de Ciéncias Farmacéuticas USP
Caixa Postal 30786
01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Verifica-se a influênciada água de maceração de milho (AMM) na propagação de *C. utilis* tendo como substrato principal o licor sulfítico (licor negro). A medida que a AMM é adicionada aos meios, o rendimento aumenta. Conclui-se que a adição de 2,5% de AMM apresenta o mais alto rendimento, equivalente a 50,4%, o que representa um incremento de 16,3%, já que nos meios sem AMM o rendimento foi de 43,1%.

Summary

Influence of corn steep liquor on growth of Candida utilis in spent sulfite liquor

The influence of corn steep liquor on *C. utilis* growth is checked where spent sulfite liquor (black liquor) is the main substratum. Yield grows up while corn steep liquor is supplied to media. A 2.5% corn steep liquor supply showed the best yield giving about 50.47% comparing to 34.13% in a corn steep liquor free medium.

Introdução

A água de maceração de milho é um sub-produto oriundo da maceração do milho para obtenção da glicose e sua composição é muito variável, dependendo de inúmeros fatores. Suas propriedades enriquecedoras dos meios de crescimento microbiano baseiam-se no equilíbrio da sua composição (17, 18). Por outro lado, Inglett (12) relata que a composição da água de maceração de milho possui um pobre balanço de aminoácidos e é uma boa fonte de vitaminas do complexo B e as quantidades de fósforo, magnésio e potássio são críticas. Entretanto, Moraes (15) trabalhando com *B. thuringiensis*, encontrou excelente substrato na água de maceração de milho, o mesmo acontecendo com outros trabalhos (1, 2, 14, 19, 21).

O fato de *C. utilis* utilizar um grande número de compostos de carbono o torna um microrganismo muito significativo.

Quando a fonte principal de carbono é açúcar, além das hexoses, também as pentoses provenientes da hidrólise de pentosanas, podem ser assimiladas, o que represen-

ta uma vantagem sobre muitos outros microrganismos. Outro fato que caracteriza a versatilidade de *C. utilis* é que a mesma sintetiza biotina (5). Outras vitaminas do complexo B, embora não sejam sintetizadas pela levedura não são requeridas para o seu crescimento. Também não requer aminoácidos específicos e utiliza sais de amônia como fonte de nitrogênio. Estes fatos possibilitaram avanço significativo, do período pós-guerra até os presentes dias, na prática de obtenção de proteína unicelular, principalmente na utilização de uma variedade muito grande de substratos. Quanto ao licor sulfítico, efluente aquoso obtido na produção de papel ou celulose pelo processo sulfítico, muitos são os autores que ratificam a sua condição de poluente (8, 9) e, ao mesmo tempo, demonstram que *C. utilis* consegue desenvolver-se razoavelmente bem (4, 6, 7, 10, 20).

Material e Métodos

A levedura utilizada foi *C. utilis* IZ-1840, cedida gentilmente pelo Instituto Zootécnico da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. O microrganismo foi adaptado, conforme Sant'Anna & col. (20), ao licor sulfítico.

Para as centrifugações usou-se sempre Centrifuga Fanem Mod. 204N.

A água de maceração de milho (AMM) utilizada foi fornecida pelas Refinações de Milho Brasil Ltda., sendo comercializada com o nome de milhocina. A AMM foi diluída a 50% com água destilada esterilizada. A solução foi centrifugada a 3000rpm por 15 minutos e o sobrenadante distribuído em tubos de ensaio de 20ml. Em seguida, foi congelado a 20°C. A composição da AMM cedida pelas Refinações de Milho Brasil Ltda. (informação pessoal, 1981) é apenas ilustrativa devido às grandes variações a que está sujeita.

Nos experimentos em que foram usados cinzas da milhocina tomaram-se 100ml de AMM diluindo-se na proporção de 1:2 com água destilada. A mistura foi agitada por 30 minutos e, em seguida, centrifugada a 3000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi dessecado, carbonizado em chama livre e mufiado a 550°C. As cinzas foram solubilizadas em 100ml de água destilada.

Figura 1 - Crescimento de *C. utilis* em licor sulfítico enriquecido com fosfato dibásico de potássio e ureia

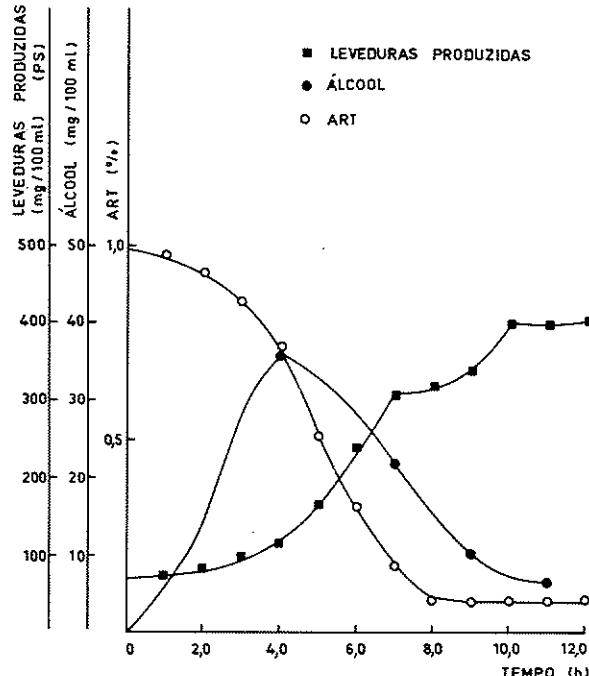
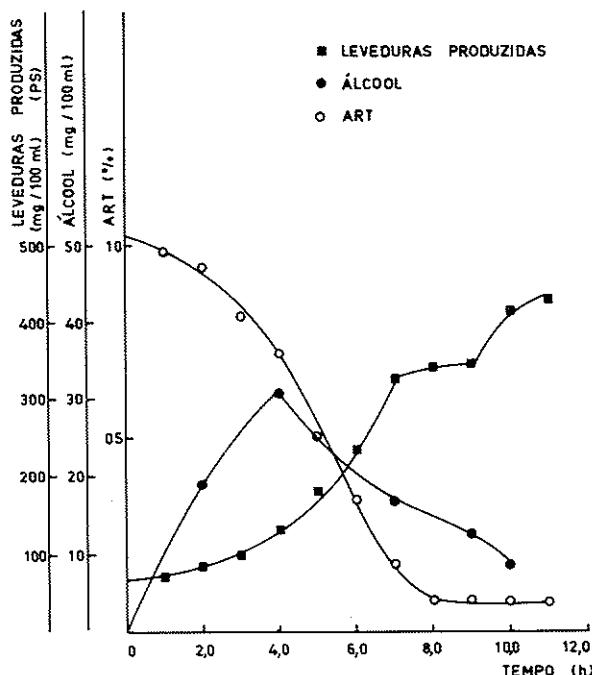


Tabela 1 - Relação entre a concentração de AMM e o rendimento obtido

Concentração de AMM (%)	Rendimento (%)
0	34,13
0,5	35,60
1,0	41,38
1,5	44,54
2,0	44,57
2,5	50,47
3,0	49,38

Figura 2 - Efeitos da adição de 0,5% de AMM sobre a multiplicação de *C. utilis* em frascos agitados



Uma parte dos experimentos fermentativos foi desenvolvida em frascos erlenmeyer de 500ml, com algumas modificações, de tal forma a terem três aletas internas que permitissem uma maior turbulência e consequente aeração. O agitador utilizado foi de rotação fixa em 180rpm com passo de 3cm e a temperatura de propagação dos microrganismos foi regulada em sala termostatizada, a 30°C. Como anti-espumante, foi utilizado o silicone SE 2 da Wacker Química do Brasil, o qual foi diluído na proporção de 1:10 e desta diluição tomou-se 0,1ml para cada 100ml de meio.

Candida utilis, previamente adaptada, foi mantida em Agar Sabouraud inclinado, contendo licor sulfítico. Uma alçada do microrganismo foi transferida para um tubo de ensaio o qual continha 200ml de meio com 0,5% de glicose, 0,1% de uréia, 0,05% de fosfato dibásico de potássio e 1,0% de extrato de malte, em licor sulfítico. O pH do meio foi ajustado em 4,5. A levedura desenvolvida neste meio foi utilizada para inocular 100ml do mesmo meio em um dos frascos de 500ml. O frasco foi agitado durante 24 horas a 180rpm e, após este período, 50ml do meio foi centrifugado a 2000rpm durante 5 minutos; as células centrifugadas foram lavadas com água destilada esterilizada e novamente centrifugadas. O sobrenadante foi então desprezado e as células foram ressuspensas no volume original e usadas para

Tabela 2 - Crescimento de *Candida utilis* em meios contendo licor sulfítico e concentrações crescentes de AMM durante 15 horas (experimento em agitador). Concentração inicial de ART = 0,99%

Meio	Concentração de AMM (%)	ART consumido (mg/l)	Levedura produzida (mg/l)	Rendimento sobre ART consumido (%)
1	0	99,8	25,3	25,35
2	0,5	105,7	27,69	26,20
3	1,0	170,6	50,12	29,38
4	1,5	260,8	84,62	32,45
5	2,0	395,7	152,77	38,61
6	2,5	526,0	219,86	41,80
7	3,0	585,2	266,85	45,60
8	3,5	690,3	330,65	47,90
9	4,0	860,9	428,72	49,80
10	4,5	930,5	468,04	50,30
11	5,0	940,5	473,82	50,38
12	5,5	940,5	471,09	50,09

inocular 1 litro do meio a ser estudado, o qual foi distribuído em frascos erlenmeyer de 500ml com volume útil de 100ml. Os açúcares redutores totais foram determinados por Somogyi (25), o álcool conforme Palácio (16), o peso celular foi determinado por método gravimétrico (3) e as hexoses e pentoses, conforme a AOAC (3).

Resultados e Discussão

Crescimento em meio sem AMM - A Figura 1 apresenta o crescimento de *C. utilis* em licor sulfítico enriquecido com fosfato dibásico de potássio (0,05%) e uréia (0,1%). O total de células no meio, ao término de 10 horas, em peso, foi de 405,75mg/100ml para um inóculo inicial de 71,25mg/ml. Levando-se em consideração que a concentração inicial é de 17,25mg/100ml, e que a concentração inicial de açúcares redutores totais do meio foi de 0,98% (p/v), obtém-se um rendimento de 34,13%. Isso não chega a ser um resultado muito satisfatório, já que nas mesmas condições, normalmente, esses resultados atingem 50% (11, 27, 28). Praticamente todo o açúcar aproveitável, foi desdobrado em oito horas de fermentação e o crescimento máximo deu-se em torno de 10 horas. O baixo rendimento obtido pode ser atribuído, entre outras causas, à ineficiência do sistema (18, 22, 23, 24). Normalmente, sob condições aeróbias, a utilização do carbono para produção de álcool é muito pequena. Neste caso, entretanto, a biosíntese de álcool foi crescente nas primeiras quatro horas, atingindo 36,0mg/100ml de meio. Levando-se em consideração que o açúcar disponível para a produção do álcool, era de 0,70g e que a síntese do álcool pelos microrganismos obedece à equação de Gay-Lussac, aproximadamente 10% do provável açúcar disponível foi utilizado para essa síntese. Embora possam ser considerados altos os valores obtidos para o álcool produzido, outros autores encontraram, para o mesmo período de tempo, uma quantidade de álcool equivalente a 57,1ml de álcool por 100ml de meio, para 0,95% de açúcares redutores totais. A partir da quarta hora de fermentação, a produção de álcool começa a diminuir, bem como a

Figura 3 - Efeitos da adição de 1,0% de AMM sobre a multiplicação de *C. utilis* em frascos agitados

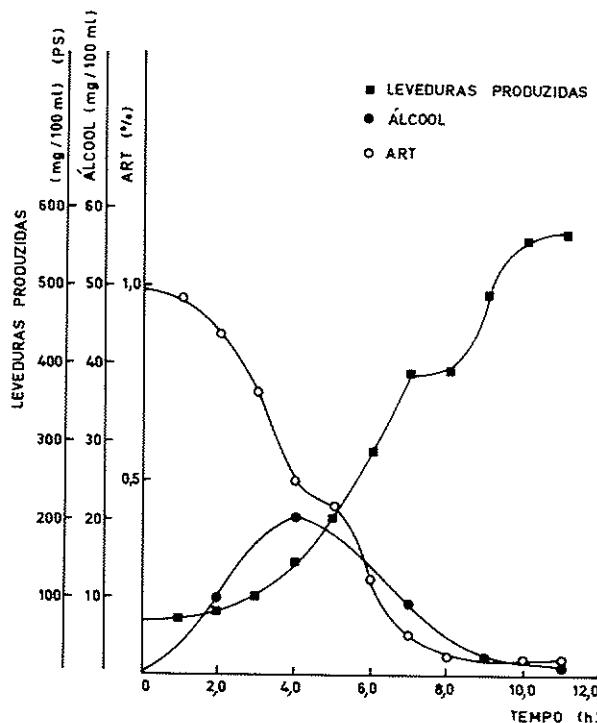


Tabela 3 - Crescimento de *Candida utilis* em meios contendo licor sulfítico e concentrações crescentes de cinza: de AMM durante 15 horas (experimento em agitador). Concentração inicial de ART = 1,02%

Meio	Concentração de ART consumido cinzas de AMM (%)	Levedura produzida (mg)	Rendimento sobre ART consumido (%)
1	0	103,9	25,4
2	0,5	129,7	30,2
3	1,0	168,4	30,4
4	1,5	216,6	33,8
5	2,0	372,0	37,3
6	2,5	480,3	42,3
7	3,0	510,6	46,1
8	3,5	632,7	46,8
9	4,0	866,3	48,7
10	4,5	910,8	49,3
11	5,0	925,4	49,8
12	5,5	938,6	49,7
13	6,0	937,9	49,9

quantidade de álcool existente no meio, provavelmente a partir do momento em que as hexoses são consumidas (teoricamente a glicose) ou desdobradas. O substrato (fontes de carbono disponíveis) passa então a ser pentoses e etanol. O fato de *C. utilis* metabolizar mais facilmente as hexoses que as pentoses (13) pode justificar um "platô" que se forma na curva de crescimento celular a partir da sétima hora, conforme mostra a Figura 1. Esta queda no crescimento exponencial pode ser em função de um breve período de adaptação dos microrganismos frente ao novo substrato a ser desdoblado.

*Crescimento em meios com AMM - As Figuras 2 a 7 correspondem à adição de 0,5 a 3,0% de AMM ao meio, contendo licor sulfítico enriquecido com fosfato dibásico de potássio e uréia nas mesmas concentrações já indicadas. Vê-se que a concentração celular, nos meios, aumenta à medida que se aumenta a concentração de AMM nos meios desde 433,5mg/100ml até 567,0mg/100ml. Esse maior crescimento celular só aparece ao nível de 2,5% de AMM. Observa-se que adicionando AMM, o "platô" da curva de crescimento celular, vai diminuindo à medida que a concentração de AMM aumenta. Segundo a literatura (26), *C. utilis* cresce muito bem em meios livres de vitaminas, embora muitas linhagens tenham o seu crescimento estimulado pela tiamina. A adição de AMM de alguma forma favoreceu o desenvolvimento destes microrganismos, seja pela adição de um complexo vitamínico, seja pela adição de qualquer outro micronutriente ao meio. Em termos de rendimento, o efeito da adição de AMM pode ser resultado pela comparação com a Tabela 1. A biosíntese de álcool também diminui à medida que se adiciona AMM. Quando se adiciona 0,5% o máximo de álcool produzido é da ordem de 31,00mg/100ml descendo até 20,50mg com 2,5% e 21,50mg com 3,0% de AMM (Figuras 2 a 7). Através do consumo de açúcares também nas mesmas Figuras 2 a 7, se pode observar este fato.*

*Consumo de hexoses e pentoses - A Figura 8 apresenta o consumo de açúcares por *C. utilis* em meio composto por licor sulfítico, contendo 1,063% (p/v) de açúcares redutores totais, 0,1% de uréia, 0,05% (p/v) de fosfato dibásico de potássio e 2,5% (v/v) de AMM.*

Figura 4 - Efeitos da adição de 1,5% de AMM sobre a multiplicação de *C. utilis* em frascos agitados

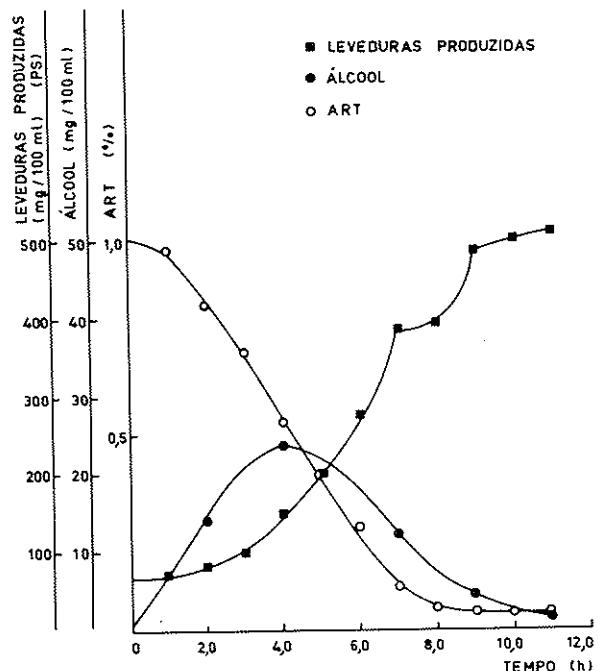
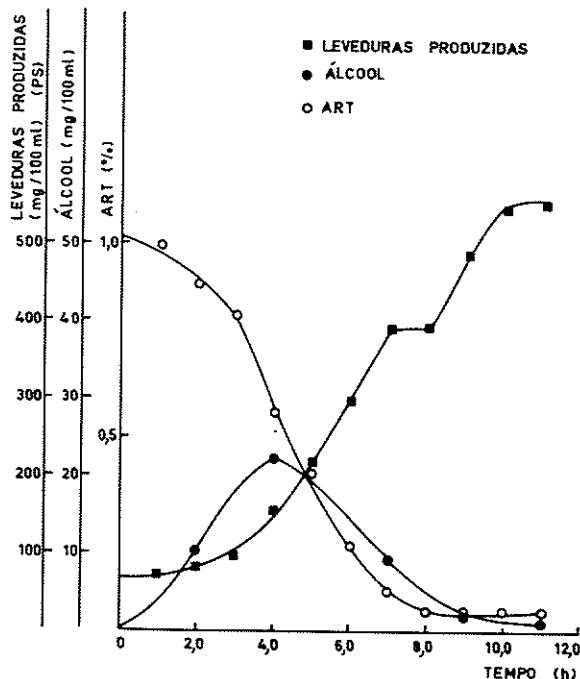


Figura 5 – Efeitos da adição de 2,0% de AMM sobre a multiplicação de *C. utilis* em frascos agitados



O total de hexoses (em relação ao licor sulfítico) é da ordem de 0,76g/100ml (72,34%) e o de pentoses 0,29g/100ml de meio (27,65%). Nas primeiras 6 horas de fermentação ocorre uma utilização intensa das hexoses e uma utilização lenta das pentoses, caracterizando uma preferência pela metabolização das hexoses. Praticamente toda a hexose foi consumida em um período de 8 horas; o mesmo acontecendo com os açúcares determinados como sendo pentoses.

Figura 6 – Efeitos da adição de 2,5% de AMM sobre a multiplicação de *C. utilis* em frascos agitados

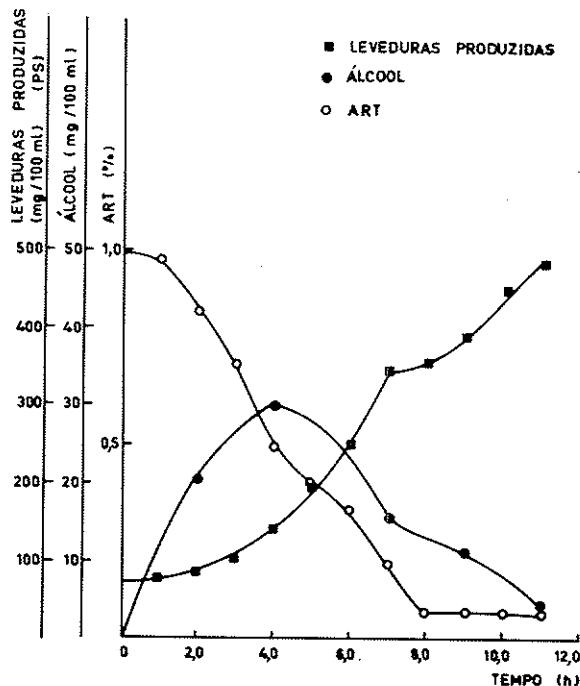


Figura 7 - Efeitos da adição de 3,0% de AMM sobre a multiplicação de *C. utilis* em frascos agitados

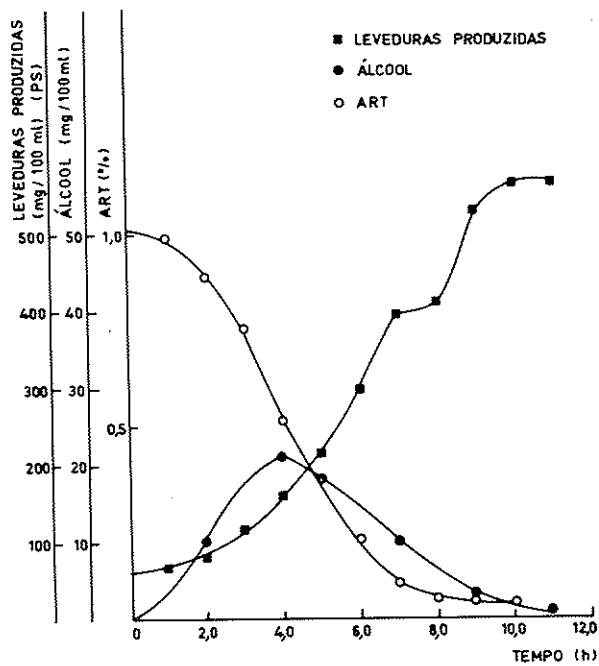
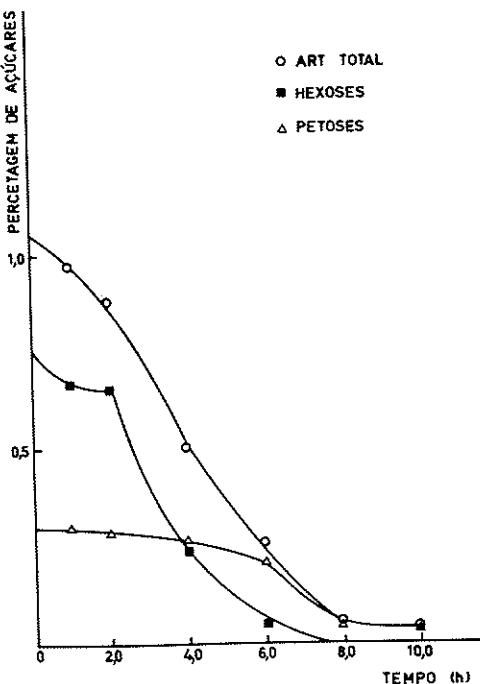


Figura 8 - Consumo de açúcares por *C. utilis* em meio composto por licor sulfítico contendo 1,065g% de ART, 0,1% de uréia, 0,05% de fosfato dibásico de potássio e 2,5% de AMM



Crescimento em meios com AMM e sem nutrientes - A Tabela 2 apresenta o crescimento de *C. utilis* em meios contendo licor sulfítico e concentrações crescentes de AMM durante 15 horas de fermentação. Desta forma, a única fonte de nitrogênio e minerais passa a ser aquela fornecida pela AMM. Observa-se que o percentual de leveduras produzidas aumenta à medida que é aumentada a quantidade de AMM até 5%, quando então a produção parece ficar limitada pelas características do próprio microrganismo e do meio de crescimento.

Crescimento em meios com cinzas de AMM e 0,1% de uréia - Observando a Tabela 3, verificamos que 5% de cinzas de AMM é o máximo rentável para suplementar os meios. Nessa concentração, a produção de células foi de 460,84mg/100ml de meio e o rendimento de 49,8%.

Embora o crescimento e o rendimento tenham sido melhores com suplementações de 5,5% e 6,0% de AMM, pode-se dizer que esta melhoria não foi muito significativa, podendo-se considerar as três últimas concentrações como um patamar no crescimento celular e no rendimento. Comparando-se as Tabelas 2 e 3, verificamos que para a mesma concentração de 5% de AMM, o crescimento e o rendimento variaram muito pouco. Para o primeiro caso, encontramos 473,82mg/100ml e 50,38% e, para o segundo, caso, de 460,84mg/100ml e 49,8%, respectivamente; parece, pois, que o que influiu no crescimento celular com relação à água de maceração de milho é, principalmente, sua porção mineral.

Referências Bibliográficas

- Agarwal, P.N.; Singh, K.; King, P.S. & Peterson, W.H. - Yields and vitamin content of food yeasts grown in different kinds of molasses. Arch. Biochem., 14:105-115, 1947.

2. Agarwal, P.N. & Peterson, W.H. - Utilization of non-sugar carbon of molasses by food yeasts. *Arch. Biochem.*, 20:57-74, 1949.
3. Association of Official and Agricultural Chemistry - AOAC - Official methods of analysis. 13.ed. Washington, 1980.
4. Casida Jr., L.E. - Industrial microbiology. New York, J. Wiley & Sons, p.367-368, 1968.
5. Chang, W.S. & Peterson, W.H. - Factors affecting the biotin content of yeasts. *J. Bacteriol.*, 58:33-44, 1949.
6. Deken De, R.H. - The crabtree effect: a regulatory system in yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 44:149-156, 1966.
7. Ferro, P.U.A.S. & Ham, A.M. - Colorimetric determination of calcium by chloranilic acid . II - A semi-micro method with reduced precipitation time. *Amer. J. Clin. Path.*, 28:689-692, 1975.
8. Frey, C.M. - History and development of the modern yeast industry. *Ind. and Engineering Chem.*, 22:1154-1162, 1930.
9. Goyco, J.A. & Asenjo, C.F. - Net protein and growth-promoting values of three different types of yeasts prepared under identical conditions. *J. Nutrition*, 36:517-526, 1949.
10. Harris, E.E.; Salman, J.F.; Marquardt, R.R.; Hannan, M. & Rogers, S.C. - Fooder yeast from wood hydrolyzates and still residues. *Ind. and Engineering Chem.*, 40:1220-1223, 1948.
11. Holderby, J.M. & Moggio, W.A. - Utilization of spent sulfite liquors. *J. WPCF*, 32:171-181, 1960.
12. Inglett, G.E. - Corn: culture, processing, products. Westport, The Avi Publishing, 1970.
13. Inskeep, G.C.; Wiley, A.J.; Holderby, J.M. & Hughes, L.P. - Food yeast from sulfite liquor. *Ind. and Engineering Chem.*, 43:1702-1711, 1951.
14. Litchfield, J.H. - Production of single-cell protein for use in food or feed. In: - Peppler, H.J. & Perlman, D., eds. - Microbial technology. 2.ed. New York, Academic Press, v.1, p.109-146, 1979.
15. Moraes, I.O. - Ensaios de fermentação submersa para produção de um inseticida bacteriano em um mini fermentador. Campinas, Unicamp, 1976. (Tese).
16. Palacio, H. - Fabricación de alcohol. Barcelona, Salvat, 1956.
17. Prescott, S.C. & Dunn, C.G. - Industrial microbiology. 3.ed. Tokio, Kogakusha, 1959.
18. Rhodes, A. & Fletcher, D.L. - Princípios de microbiologia industrial. Zaragoza, Acribia, 1969.
19. Sant'Anna, E.S. - Influência da água de maceração de milho na produção de leveduras de panificação. Campinas, Unicamp, 1979. (Tese).
20. Sant'Anna, E.S. & Aquarone, E. - Licor sulfítico (licor negro) como substrato para o crescimento de *C. utilis*: estudo experimental. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 14:285-289, 1983.
21. Sing, K.; Agarwal, P.N. & Peterson, W.H. - The influence of aeration and agitation on the yield, protein and vitamin content of food yeast. *Arch. Biochem.*, 18:181-193, 1948.
22. Solomons, G.L. - Anti-goans. *Process Biochem.*, Oct:47-48, 1967.
23. Straskraba, V.; Páca, J. & Kralickova, E. - Effect of aeration and carbon dioxide on cell morphology of *Candida utilis*. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 40:855-861, 1980.
24. Strohm, J.A. & Dale, R.F. - Dissolved oxygen measurement. *Ind. and Engineering Chem.*, 53:760-764, 1961.
25. Somogyi, M. - A new reagent for the determination of sugar. *J. Biol. Chem.*, 160:61-69, 1945.
26. Uden, N. & Buckley, H. - Genus. 2 - *Candida berkhout*. In: - Lodder, J., ed. - The yeast: a taxonomic study. Amsterdam, North-Holland, p.1064-1066, 1970.
27. Wiley, A.J. - Food and feed yeast. In: - Underkofler, L.A. & Hickey, R.J., eds. - Industrial fermentations. *Chem. Pub.*, 1:307-343, 1954.
28. Wiley, A.J.; Dubey, G.A.; Lueck, B.F. & Hughes, L.P. - Torula yeast grown on spent sulfite liquor. *Ind. and Engineering Chem.*, 42:1830-1833, 1950.

MICROBIOTA FÚNGICA ANEMÓFILA DA CIDADE DE PRESIDENTE PRUDENTE, ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL

Nelson Buck
Valdemir Gambale

Deptº de Ciências Ambientais
Instituto de Planejamento e Estudos Ambientais Unesp
Caixa Postal 957
19100 Presidente Prudente SP, Brasil

Walderez Gambale
& Claudete Rodrigues Paula

Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374/2º andar
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

A microbiota fúngica anemófila de Presidente Prudente foi estudada no período de um ano, através de 156 exposições de placas de Petri, contendo meio de cultura, em diferentes pontos da cidade. Foram isolados 30 gêneros de fungos anemófilos, sendo 18 com frequência acima de 10%. A distribuição dos gêneros variou nos diferentes pontos de coleta. A maioria dos fungos apresentou frequência maior na primavera e mínima no outono. Os gêneros *Monascus*, *Neurospora*, *Trichotecium* e *Cryptococcus* ocorreram em frequências altas, ao contrário do que ocorre em outras cidades brasileiras. *Alternaria*, gênero de grande importância alergológica, foi isolado com frequência de 16,0%.

Summary

Airborne fungi of Presidente Prudente SP, Brasil

The airborne fungi of Presidente Prudente, SP, Brasil, was studied during a period of one year by means of 156 exposures of Petri dishes with culture medium, at different localities in the city. 30 genera of fungi were isolated; 18 with a frequency above 10%. Their distribution varied at different collecting points. Most of presented higher frequencies in spring and lower in autumn. The genera *Monascus*, *Neurospora*, *Trichotecium* and *Cryptococcus* occurred with higher frequency values quite different from the values observed in other Brazilian cities. The genus *Alternaria* with strong allergenic power was been isolated with 16,0% frequency.

Introdução

A partir dos trabalhos de Blackley (4), foram realizados estudos com o intuito de estabelecer, em várias regiões, a microbiota fúngica anemófila, visando principalmente a elaboração de mapas alergênicos, para auxiliar o diagnóstico de problemas alérgicos respiratórios provocados por fungos (12).

Tabela 1 - Frequência relativa dos gêneros de fungos anemófilos isolados na cidade de Presidente Prudente, no período de maio/1982 a abril/1983

<i>Cladosporium</i>	74,3	<i>Penicillium</i>	17,9	<i>Helminthosporium</i>	2,7
<i>Aspergillus</i>	55,8	<i>Mucor</i>	17,3	<i>Petronellaeeae</i>	1,9
<i>Monascus</i>	44,2	<i>Alternaria</i>	16,0	<i>Monosporium</i>	1,3
<i>Aureobasidium</i>	37,2	<i>Epicoccum</i>	16,0	<i>Torulopsis</i>	0,6
<i>Neurospora</i>	35,9	<i>Phoma</i>	13,5	<i>Abertia</i>	0,6
<i>Fusarium</i>	26,9	<i>Trichotecium</i>	10,2	<i>Geotrichum</i>	0,6
<i>Rhizopus</i>	26,9	<i>Curvularia</i>	10,2	<i>Paecilomyces</i>	0,6
<i>Trichoderma</i>	24,4	<i>Cryptococcus</i>	10,2	<i>Cephalosporium</i>	0,6
<i>Rhodotorula</i>	22,4	<i>Trichosporon</i>	3,8	<i>Nigrospore</i>	0,6
<i>Candida</i>	20,5	<i>Fusidium</i>	3,8	<i>Mycelia sterilia</i>	44,2

Tabela 2 - Número de colônias dos fungos com frequência acima de 10% nos diversos bairros de Presidente Prudente

Gênero	Locais						
	Museu	Jard. Bonipov.	Parque	Jard. Brasil	Centro	Jard. Aviação	Total
<i>Cladosporium</i>	232	124	198	167	169	139	1029
<i>Aspergillus</i>	167	147	76	43	84	84	601
<i>Monascus</i>	21	29	32	66	23	25	196
<i>Aureobasidium</i>	44	31	33	35	20	25	188
<i>Neurospora</i>	86	109	51	109	68	72	495
<i>Fusarium</i>	10	65	25	5	22	26	153
<i>Rhizopus</i>	22	83	53	59	51	73	341
<i>Trichoderma</i>	33	23	17	38	22	22	155
<i>Rhodotorula</i>	9	25	27	4	12	9	86
<i>Candida</i>	20	68	36	6	23	3	156
<i>Penicillium</i>	45	11	30	26	14	12	138
<i>Mucor</i>	35	21	17	35	10	22	140
<i>Alternaria</i>	12	4	14	11	31	10	82
<i>Epicoccum</i>	50	2	30	9	10	5	106
<i>Phoma</i>	7	3	15	12	3	6	51
<i>Trichotecium</i>	23	1	13	6	11	13	67
<i>Curvularia</i>	15	4	22	9	9	1	60
<i>Cryptococcus</i>	12	2	10	4	4	6	38
<i>Mycelia sterilia</i>	52	40	77	65	51	49	334
Total	895	792	776	709	642	602	4416
Número de coletas	26	26	26	26	26	26	156

Tabela 3 - Distribuição sazonal dos fungos com frequência acima de 10%, na cidade de Presidente Prudente

Gênero	Primavera	Verão	Outono	Inverno
<i>Cladosporium</i>	77,8	66,7	63,9	88,1
<i>Aspergillus</i>	52,8	47,6	52,8	69,0
<i>Monascus</i>	66,7	38,1	16,7	54,8
<i>Aureobasidium</i>	44,4	26,2	38,9	40,5
<i>Neurospora</i>	55,5	33,3	36,1	21,4
<i>Fusarium</i>	33,3	35,7	13,9	23,8
<i>Rhizopus</i>	36,1	23,8	13,9	33,3
<i>Trichoderma</i>	38,9	21,4	13,9	23,8
<i>Rhodotorula</i>	16,7	7,1	30,5	35,7
<i>Candida</i>	19,4	31,0	8,3	21,4
<i>Penicillium</i>	11,1	4,8	25,0	31,0
<i>Mucor</i>	22,2	31,0	8,3	7,1
<i>Alternaria</i>	27,8	16,7	19,4	2,4
<i>Epicoccum</i>	8,3	9,5	19,4	26,2
<i>Phoma</i>	25,0	9,5	5,5	14,3
<i>Trichotecium</i>	-	21,4	19,4	-
<i>Curvularia</i>	5,5	26,2	2,8	4,8
<i>Cryptococcus</i>	8,3	-	22,2	11,9
<i>Mycelia sterilia</i>	55,5	50,0	19,4	50,0

No Brasil, poucas são as publicações sobre fungos anemófilos, resumindo-se às seguintes cidades: Belém (4), Belo Horizonte (5), Piracicaba (14), Porto Alegre (9), Recife (11), Rio de Janeiro (10), Santos (15), São Paulo (7) e Curitiba (8).

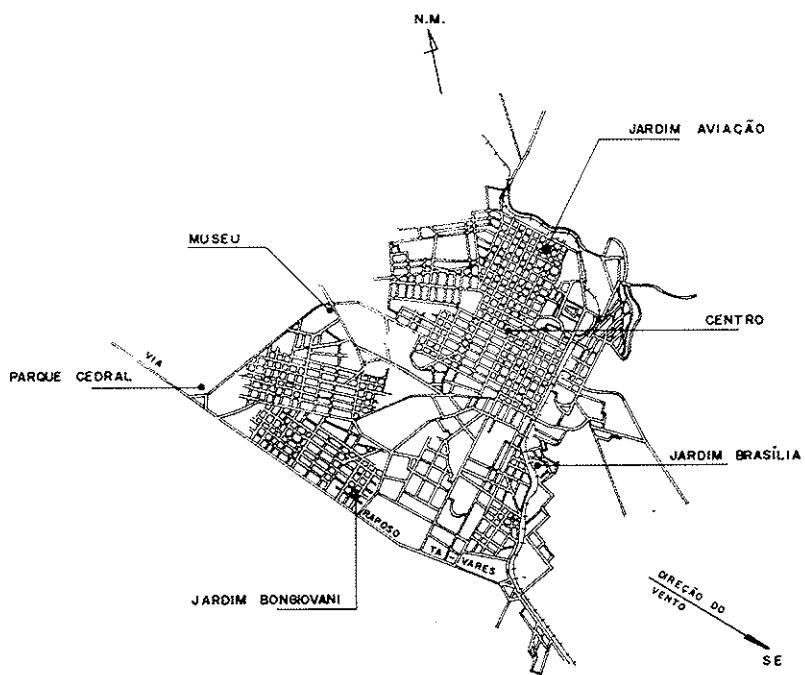
Através desses trabalhos, observa-se que os fungos mais frequentes nas cidades brasileiras pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Aspergillus*. Além desses, verificam-se outros gêneros, que são isolados em uma ou outra cidade, mas não em todas (7).

Segundo as recomendações de Mendes (12), a presente pesquisa visa detectar a microbiota fungica anemófila de Presidente Prudente, estabelecer variações sazonais dos gêneros mais frequentes e comparar os resultados com os obtidos nas outras cidades brasileiras.

Material e Métodos

Presidente Prudente está situada a 22°07'00"S e 51°27'57"W, numa altitude de 472m. Seu clima é enquadrado na classificação de Köppen como cWa. Apresenta inverno seco e verão chuvoso. A temperatura média anual é de 22,5°C.

Figura 1 – Locais de coleta em Presidente Prudente



Discussão

A maioria dos gêneros ocorreu com frequências mais altas na primavera, resultado não condizente com o obtido em Belo Horizonte (5), São Paulo (7), Santos (15), cidades em que a concentração maior de fungos ocorre no inverno e em Curitiba (8) no verão. Nossos resultados mostraram que o aumento da frequência da maioria dos gêneros de fungos coincidiu, no período de observações, com o aumento da velocidade do vento, no inverno (Tabelas 3 e 4). No entanto, conforme Faria (5), a concentração de esporos na atmosfera varia de acordo com diferentes fatores, tais como: elevação da pressão atmosférica, evaporação, e velocidade do vento, e com a diminuição de temperatura, umidade relativa e precipitação. Gambale (6) encontrou ação diferente dos fatores climáticos, sobre um mesmo fungo, em diferentes períodos do dia. Chamou atenção para o fato de que a ação desses fatores deve-se à resultante das ações, sobre cada gênero existente num ecossistema, sugerindo as causas pelas contradições observadas entre inúmeros pesquisadores.

O número de colônias de fungos foi maior nos locais das zonas Norte e Oeste, de pequena densidade demográfica e menor nas zonas leste e Sul, urbanas, de maior densidade demográfica. Os ventos atingem a cidade pelo flanco NO (Fig. 1), onde se situam os locais com maior número de fungos.

Na Tabela 5 verifica-se que em Presidente Prudente, à semelhança de outras cidades brasileiras, ocorre em maior frequência os "dominantes universais" (13). Apresenta, ainda, em alta frequência, alguns fungos que não ocorreram nas outras cidades brasileiras: *Monascus*, *Neurospora*, *Trichotecium* e *Cryptococcus*.

Dentre essas cidades brasileiras, observa-se que São Paulo e Belo Horizonte apresentam semelhanças entre si e com Presidente Prudente, quanto à microbiota anemófila, fato que para as duas primeiras, segundo Gambale (7) pode estar relacionado com semelhanças ambientais. No entanto, qualquer afirmação neste sentido, carece no momento, de dados estatísticos significativos, ainda não disponíveis na literatura especializada.

O presente trabalho demonstrou ainda, a ocorrência do gênero *Alternaria*, fungo de importância alergológica, considerado até há pouco tempo ausente no Brasil. Esse fungo foi isolado em Presidente Prudente, em todos os locais estudados, assim como em todas as épocas sazonais.

Tabela 4 - Média sazonal dos fatores climáticos na cidade de Presidente Prudente, obtidas junto à Estação Meteorológica do IPEA, no período de maio/1982 a abril/1983

		Primavera	Verão	Outono	Inverno
Pres. Bar.	mm/Bg	727,8	727,0	727,9	729,3
Insol. Hor.	décimos/h	1,8	20,7	1,8	2,7
Precipitação	mm	96,0	140,0	65,9	30,0
Umid. Rel.	%	80,7	81,4	83,5	80,6
Veloc. do vento	Km/h	3,3	2,2	3,1	2,8
Temperatura	°C	22,4	24,6	18,0	18,6

Tabela 5 - Fungos anemófilos com frequência acima de 10%, isolados em diversas cidades brasileiras (expressas em %).

Símbolos: PP = Presidente Prudente (presente trabalho); RE = Recife (11); SP = São Paulo (7); BH = Belo Horizonte (5); BE = Belém (4); RJ = Rio de Janeiro (10); BS = Baixada Santista (15); PI = Piracicaba (14); PA = Porto Alegre (9); CR = Curitiba (8)

Gênero	Cidades										
	PP	RE	SP	BH	BE	RJ	BS	PI	PA	CR	
<i>Cladosporium</i>	74,3	20,8	64,8	90,3	17,5	15,0	48,8	50,0	-	32,9	
<i>Aspergillus</i>	55,8	58,9	23,3	58,6	63,8	10,0	23,7	43,7	46,6	43,4	
<i>Monascus</i>	44,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Aureobasidium</i>	37,2	10,8	19,9	31,9	-	-	15,5	-	-	-	
<i>Neurospora</i>	35,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Fusarium</i>	26,9	19,6	14,0	24,7	14,5	-	17,4	-	-	-	
<i>Rhizopus</i>	26,9	-	-	-	-	-	10,1	18,1	-	10,5	
<i>Trichoderma</i>	24,4	-	11,2	-	15,0	-	-	-	-	-	
<i>Rhodotorula</i>	22,4	-	48,9	28,0	-	10,0	-	12,5	-	14,5	
<i>Candida</i>	20,5	30,6	14,7	16,7	-	-	-	31,2	-	-	
<i>Penicillium</i>	17,9	41,4	41,7	64,7	36,6	20,0	51,2	62,3	-	43,1	
<i>Mucor</i>	17,3	-	-	-	26,9	-	-	-	-	-	
<i>Alternaria</i>	16,0	-	17,0	21,1	-	-	-	-	-	10,9	
<i>Epicoccum</i>	16,0	-	51,7	31,0	-	-	23,7	-	-	14,5	
<i>Phoma</i>	13,5	19,4	17,7	29,7	-	-	-	-	-	-	
<i>Trichotectium</i>	10,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Curvularia</i>	10,2	18,9	-	33,3	68,3	-	10,5	-	-	-	
<i>Cryptococcus</i>	10,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

A coleta dos fungos foi feita, através de exposição ao ar de placas de Petri com ágar Sabouraud, em seis locais da cidade (Fig. 1): Museu (zona urbana industrial); Jardim Bongiovani (zona urbana); Parque Cedral (zona urbano-rural); Jardim Brasilia (zona urbano-industrial); Centro e Jardim Aviação (zona urbana).

As placas foram expostas 15 minutos, a cada 15 dias, em todos os locais, às 9 horas e a 1,20 metros de altura do solo, durante o período entre maio de 1982 e abril de 1983. Após as exposições, as mesmas foram incubadas a 27°C, durante 4 dias, e as colônias crescidas, contadas e isoladas. A identificação dos fungos foi feita através de metodologia pertinente (1, 2, 3).

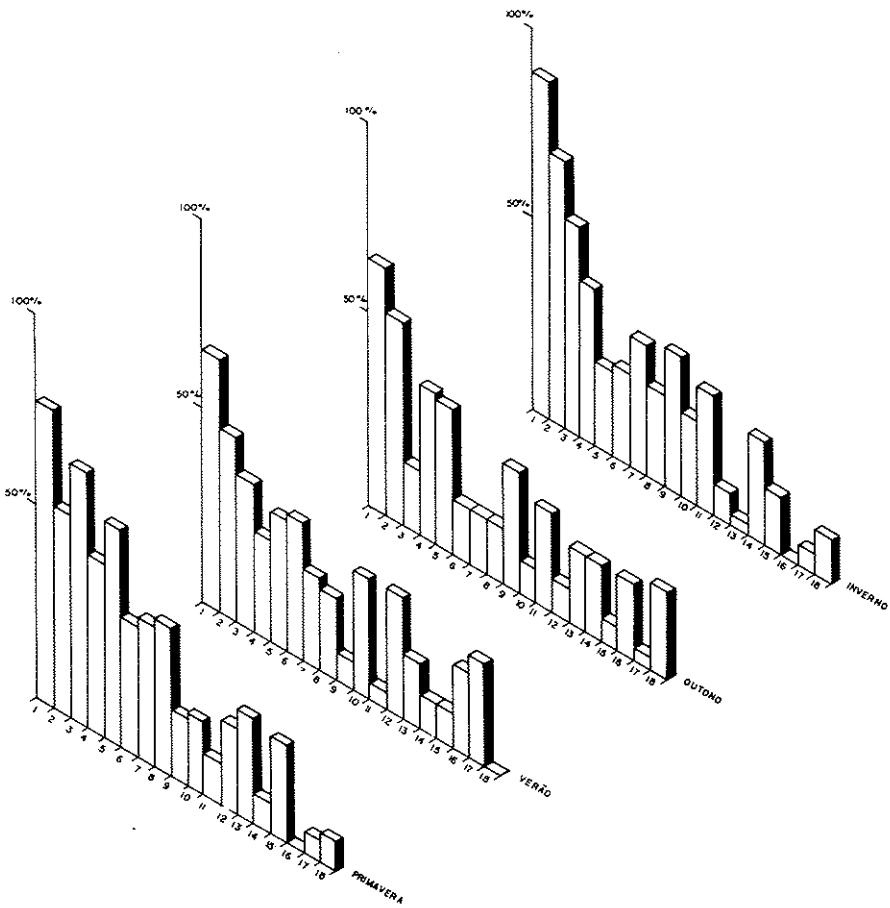
Resultados

Através de 156 exposições foram isolados 29 gêneros de fungos e um conjunto de formas não esporuladas, agrupadas como *Mycelia sterilia*, cujas frequências encontram-se na Tabela 1. Desses fungos, os de frequência acima de 10% foram isolados praticamente em todas as épocas sazonais e em todos os locais, sendo *Cladosporium* o gênero mais frequente (Fig. 2). Maior número total de colônias verificou-se no Museu, seguido em ordem decrescente por: Jardim Bongiovani, Parque Cedral, Jardim Brasilia, Centro e Jardim Aviação (Tabela 2).

Os gêneros *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Penicillium* e *Epicoccum* atingiram maiores frequências no inverno; *Monascus*, *Aureobasidium*, *Neurospora*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Alternaria*, *Phoma* e *Mycelia sterilia* na primavera; *Fusarium*, *Candida*, *Mucor* e *Trichotectium* no verão e somente *Cryptococcus* no outono (Tabela 3).

Figura 2 - Variação sazonal: fungos com frequência acima de 10%.

Símbolos: 1 = *Cladosporium*; 2 = *Aspergillus*; 3 = *Monascus*; 4 = *Aureobasidium*; 5 = *Neurospora*; 6 = *Fusarium*; 7 = *Rhizopus*; 8 = *Trichoderma*; 9 = *Rhodotorula*; 10 = *Candida*; 11 = *Penicillium*; 12 = *Mucor*; 13 = *Alternaria*; 14 = *Epicoccum*; 15 = *Phoma*; 16 = *Trichotecium*; 17 = *Curvularia*; 18 = *Cryptococcus*



Referências Bibliográficas

1. Arx, J.A. von - The genera of fungi sporulating in pure culture. Germany, J. Cramer, 1974.
2. Barnet, H.L. & Hunter, B.B. - Illustrated genera of imperfecti fungi. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
3. Barron, G.L. - The genera of hyphomycetes from soil. 2.ed. New York, R.E. Krieger Pub., 1971.
4. Costa, C.A.A. - Contribuição ao estudo qualitativo da flora micótica do ar na cidade de Belém: sua possível relação com a asma brônquica e rinite alérgica. Belém, Faculdade de Medicina da Universidade do Pará, 1960. (Tese de Doutoramento).
5. Faria, A. - Aspectos ecológicos e clínicos da flora micótica anemófila de Belo Horizonte. Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da Universidade de Minas Gerais, 1967. (Tese de Doutoramento).

6. Gambale, W.; Purchio, A. & Paula, C.R. - Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 14:204-214, 1983.
7. Gambale, W.; Purchio, A. & Croce, J. - Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 8:74-79, 1977.
8. Godoy, G.F. - Contribuição ao estudo da flora micótica anemófila em Curitiba. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1976. (Tese de Livre Docência).
9. Homrich, M.H. - Observações sobre a ocorrência de esporos de fungos alergógenos no ar de Porto Alegre e arredores. *Rev. Bras. Biol.*, 21: 149-153, 1956.
10. Lima, A. de O.; Seabra, O.; França, A.T. & Cukier, J. - Incidência de fungos na atmosfera de algumas cidades brasileiras. *Hospital*, 63:1045-1054, 1963.
11. Machado, G.M.R. - Fungos anemófilos da área do Grande Recife. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 1979. (Tese de Mestrado).
12. Mendes, E. - Processos alérgicos e geografia médica. In: - Lacaz, C. da S.; Baruzzi, R.G. & Siqueira Jr., W. - Introdução à geografia médica do Brasil. São Paulo, Edgard Blucher, p.543-568, 1972.
13. Morrow, M.B.; Meyer, G.H. & Prince, H.E. - A summary of airborne mold surveys. *Ann. Allergy*, 22:575-587, 1964.
14. Pinheiro, L.F.L.; Neder, R.N. & Azevedo, J.L. - Flora micológica e bacteriana do ar na cidade de Piracicaba. *Hospital*, 69:627-633, 1966.
15. Purchio, A. - Ecossistemas fúngicos da Baixada Santista. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, 1978. (Tese de Livre Docência).

ANTIBODY-DEPENDENT CELLULAR LYSIS OF ^{3}H -LABELLED LEISHMANIA DONOVANI BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD CELLS

Eliana Dessaune Madeira
Fernanda Washington de Mendonça Lima
Antonio Carlos de Faria
Maria Luiza Baldez

Dept^o de Imunologia
Instituto de Microbiologia UFRJ
Caixa Postal 68040
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

& Antonio Campos Neto

Dept^o de Parasitologia e Microbiologia
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Campus de Ribeirão Preto
14100 Ribeirão Preto SP, Brasil

Summary

Human mononuclear and polymorphonuclear cells were tested for their ability to kill promastigote forms of *Leishmania donovani* in an antibody-dependent system. The parasite killing was measured by the release of incorporated ^{3}H -uridine. Neutrophils and eosinophils were the main cell populations responsible for isotope release from the parasite. Both of them were effective at a very low effector/target cell ratio.

Resumo

Lise celular dependente de anticorpos de Leishmania donovani por células de sangue humano periférico

Células mononucleares e polimorfonucleares, obtidas de sangue humano, foram testadas quanto à capacidade de destruir formas promastigotas de *Leishmania donovani*, num sistema dependente de anticorpos. A morte do parasita foi verificada pela liberação de ^{3}H -uridina previamente incorporada. Neutrófilos e eosinófilos foram as principais populações celulares responsáveis pelo processo, sendo eficazes, inclusive, quando empregadas em baixa relação célula efetora/célula alvo.

Introduction

The protozoa of the genus *Leishmania* are responsible for visceral (Kala-azar), cutaneous and mucocutaneous disease in humans. The immune response is invariably altered. Infection by the viscerotropic leishmanias (*Leishmania donovani*) evokes specific antibodies (14) and elevated levels of total immunoglobulins (8), whereas delayed hypersensitivity reaction to *Leishmania* antigens is always absent (6, 13). In contrast, dermotropic leishmanias (*L. brasiliensis brasiliensis* and *L. mexicana amazonensis*) stimulate a strong delayed hypersensitivity and the serum immunoglobulin concentration is normal. Specific anti-leishmania antibodies may or may not be demonstrated.

Antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) as a possible mean of defense against metazoa and protozoa has been described in models using *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi* as target organisms (2, 12, 21). Human polymorphonuclear cells were shown to be responsible for the killing of *T. cruzi* epimastigotes (12, 18) and bloodstream forms (19) in the presence of specific antisera or of the lectin Concanavalin A (Madeira & col., unpublished data). ADCC by eosinophils has been described for schistosomula in humans (3, 4) and for *T. cruzi* in rats (21). In mice both eosinophils and neutrophils were more efficient than mouse spleen cells in mediating ADCC against bloodstream forms of *T. cruzi* (11, 17).

In this paper, we study the lysis of *L. donovani* and *L. mexicana amazonensis* by human peripheral blood cell subpopulations in the presence of antibody. The main cytotoxic activity was found in the polymorphonuclear neutrophil and eosinophil fractions.

Material and Methods

Target cells - Promastigotes of *L. donovani* (Id-1S) and *L. mexicana amazonensis* (H-21) were grown at 26°C in modified of liver infusion tryptose (LIT) medium (11) supplemented with 10% fetal calf serum and containing 10 μ gCi/ml of [³H]-uridine (5,6-[³H]-uridine; 36.8 Ci/mmol; New England Nuclear Corp., Boston, Mass.) (22).

After 6 days of incubation the parasites were washed 4 times in RPMI 1640 medium plus 0,5% bovine serum albumin (BSA fraction V, Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.) and resuspended to a final concentration of 2×10^6 forms per ml. The nature of [³H]-labelled materials released from the leishmanias was investigated by enzymatic degradation and chromatography. The parasites were disrupted by freezing and thawing in phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged at 1000 x g. The supernatant was divided in three aliquots. One of them was treated with RNase type I-A (Sigma) for 30 minutes at 36°C and to another one an excess of free [³H]-uridine was added. The three samples were analysed by chromatography on a Sephadex G-25 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden).

Figure 1 - Chromatography on Sephadex G-25 of [³H]-labelled material from *L. donovani* disrupted by freezing and thawing.

Symbols: --- = Supernatant; -..- = Supernatant plus free [³H]-uridine; — = RNase-treated supernatant

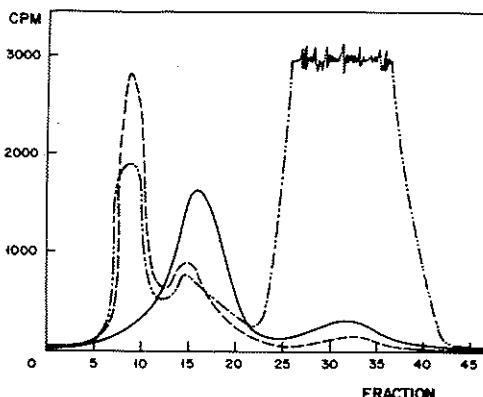


Figure 2 - Serum titration curves at an effector (PBL) target ratio of 5:1.

Symbols: — and --- = immune sera; -.- = normal rabbit serum. The spontaneous release has been subtracted from all experimental values

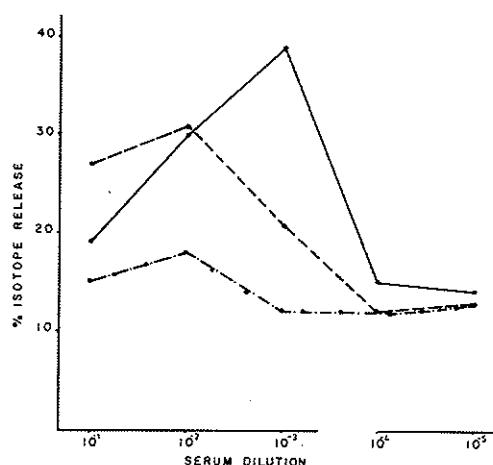
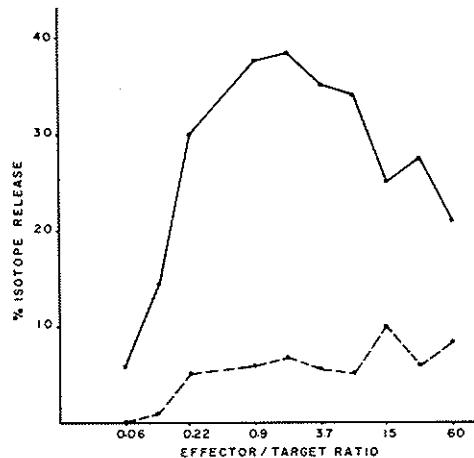


Figure 3 - Titration curve of effector cells (PBL).

Symbols: — = immune; --- = normal serum dilution of 10^{-3} . The spontaneous release has been subtracted from all experimental values

Table 1 - Cytotoxicity of human normal leukocytes to promastigotes of *L. donovani*.

Symbols: * = PBL contained 4% eosinophils, 61% neutrophils, 33% lymphocytes, 2% monocytes in Exp. 1; 2% eosinophils, 64% neutrophils, 29% lymphocytes, 5% monocytes in Exp. 2 and 4% eosinophils, 71% neutrophils, 22% lymphocytes, 3% monocytes in Exp. 3. PMN contained 7% eosinophils, 89% neutrophils, 3% lymphocytes, 1% monocytes in Exp. 1; 4% eosinophils, 88% neutrophils, 6% lymphocytes, 2% monocytes in Exp. 2 and 12% eosinophils, 83% neutrophils, 5% lymphocytes in Exp. 3. NEU had 100% neutrophils. MC contained 5% neutrophils, 90% lymphocytes, 5% monocytes in Exp. 1; 8% neutrophils, 88% lymphocytes, 4% monocytes in Exp. 3. The MCFE populations had 100% lymphocytes in Exp. 1 and 2, and 99% lymphocytes in Exp. 3. ** = % of isotope released from labelled parasites in the absence of effector cells, with immune or normal sera



Cell population*	% Isotope release					
	Immune serum			Normal serum		
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3
PBL	46	53	43	25	29	23
PMN	47	90	77	25	32	22
NEU	42	ND	ND	20	ND	ND
MC	34	51	46	24	26	20
MCFE	20	21	15	22	20	17
Control**	18	17	13	20	19	11

Effector cells - Human blood leukocytes (PBL) from healthy adult donors were obtained from heparinized (Roche Lab.) peripheral blood, by dextran sedimentation (m.w. 200.000; Sigma) and fractionated into mononuclear (MC) and polymorphonuclear (PMN) cells by Ficoll-Hypaque density gradient sedimentation (1, 12).

The MC fraction was further purified by treatment with 100 µg per ml of carbonyl iron (GAF Corp. New York, N.Y.) for 15 min at 37°C (MC Fe). The cells were immersed in an ice bath for 5 min and the iron-containing cells were eliminated by means of a magnet.

In order to obtain a sufficient amount of eosinophils to be used as effector cells, individuals with high peripheral blood eosinophil rate were selected. One of them was a seemingly healthy individual from the laboratory personnel. The other two ones were patients recovering from post-traumatic encephalitis and snake bite, respectively. The eosinophils were obtained from the PMN fraction resuspended in RPMI 1640 containing 0.15 gelatin and 30 mg/ml of DNase (DN-25, Sigma) by centrifugation over discontinuous 18, 21, 23, 25% metrizamide gradient (grade I, Sigma) at 1200 x g for 45 min. The metrizamide gradient procedure was also used to purify neutrophils from normal blood.

All cell fractions were washed 3 times in RPMI 1640 supplemented with 15 mM Hepes (N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid; Sigma), 0.5% BSA, Penicillin G (100 units/ml) and streptomycin (100 µg/ml), resuspended and counted. Cell viability was assessed by trypan blue exclusion and only subpopulations with viability greater than 96% were used. The purity of these cell populations was analysed by morphology after Giemsa stain.

Antisera - Antisera were obtained from rabbits immunized with promastigotes of *L. donovani* in complete Freund's adjuvant and tested by direct agglutination with and without 2-mercaptoethanol. Normal rabbit serum (NRS) was used as control. All sera were heat inactivated, membrane filtered (Millipore Corp., Bedford, Mass.) and stored at -40°C.

Assay system - The assay system has already been described (12). Briefly, 100µl of a suspension of [³H]-uridine labelled parasites (2×10^5 organisms), 100µl of diluted serum and 100µl of an appropriate concentration of effector cells were incubated for 4 hours at 37°C. After centrifugation at 400 x g for 10 minutes, 200µl of supernatant were collected and counted in a Liquid Scintillation Counter (Beckman LS-250, Beckman Lab. Instruments Inc.). The total isotope release was obtained by lysis of 2×10^5 parasites with Triton X-100 (Sigma). The spontaneous release was given by a mixture of *T. cruzi* with medium and was subtracted from all data presented. The percentage of isotope release was calculated as described (21).

Results

Labeling of *Leishmania donovani* with [³H]-uridine was analysed by chromatography on Sephadex G-25. The elution profile is shown in Figure 1. The [³H]-labelled material released from the leishmanias displayed three peaks: a major peak which represents molecules excluded from the column (using blue dextran as marker), a central and a minor peak. In order to define the peak given by free [³H]-uridine, we added an excess of this radio-labelled material to the supernatant released from the labelled leishmania and ran the chromatography using the previous column. Free [³H]-uridine was eluted as the most retarded peak (Figure 1). Next we ran the RNase treated supernatant. The previous first peak, which corresponds to molecules excluded from the column was no longer seen. In contrast, the radioactivity was mostly concentrated in the second peak which corresponds to the products of RNase degradation, namely, nucleotides. Therefore we could conclude that the [³H]-labelled material released from *L. donovani* is native RNA, thus implying cell lysis.

Cytotoxicity of PBL for leishmania cells was investigated using rabbit anti-*L. donovani* sera. Figure 2 shows the results obtained at a 5:1 effector/target cell ratio for two different antisera. It is clear that the cytotoxic effect of PBL for *L. donovani* was highly enhanced by the specific antisera when compared with pre-immune sera. Similar results were obtained for *L. mexicana amazonensis* (data not shown).

Figure 3 shows the titration curve of the effector cell using a serum dilution of 10^{-3} . The best cytotoxic effect was achieved with a broad range of effector/target cell ratios varying from 5.5:1.0 to 0.7:1.0. In contrast, NRS was unable to enhance cell cytotoxic compared to medium. The "prozone"-like effect observed with the antiserum is apparently a common phenomenon in cytotoxicity when the target cells are protozoa (12).

Table 2 - Cytotoxicity of eosinophils from eosinophilic patients to promastigotes of *L. donovani*.

Symbols: * = PBL contained 40% eosinophils, 13% neutrophils, 46% lymphocytes, 1% monocytes in Exp. 1 and 37% eosinophils, 18% neutrophils, 43% lymphocytes, 2% monocytes in Exp. 2. EOS contained 100% eosinophils in Exp. 1 and 92% eosinophils, 7% neutrophils, 1% lymphocytes in Exp. 2; ** = % of isotope released from labelled parasites in the absence of effector cells, with immune or normal sera

Cell population *	% Isotope release			
	Immune serum Exp. 1	Immune serum Exp. 2	Normal serum Exp. 1	Normal serum Exp. 2
PBL	55	54	34	31
EOS	57	55	32	30
Control**	25	18	26	20

In order to characterize the effector cells involved in the killing of *L. donovani*, the cell populations were assayed separately at an effector/target cell ratio of 5:1. Table 1 shows that MC and PMN cells in a higher extension were effective in releasing [³H]-labelled RNA from parasites. The MC were invariably contaminated with less than 10% of granulocytes. The PMN population contained less than 8% of MC cells. The MCFe, depleted from iron-containing cells, were no more capable of inducing isotope release from labelled parasites.

Two typical experiments using eosinophils from hipereosinophilic patients are presented in Table 2. It was observed invariably a high lytic activity by eosinophils at an effector/target ratio of 2:1.

Discussion

The results presented in this paper show that the killing of *L. donovani* can be studied by using [³H]-uridine which is incorporated in to RNA as a label for the target cell.

The consistent presence of a high lytic activity in the PMN fraction suggests that the cytotoxicity to *L. donovani* and *L. mexicana amazonensis* is associated with the presence of granulocyte rather than mononuclear cells, as has been shown for other parasites (2, 11, 12, 24). The activity of these cells was further studied both with neutrophil-rich populations, sometimes completely depleted of eosinophils, and with eosinophils preparations. Both cell populations mediated the killing of antibody coated parasites. The significant isotope release observed with the MC population can be due to granulocytic contamination, since the iron-depleted lymphocytes did not operate anymore. The possibility that carbonyl iron damages the lymphocytes seems not to be the case (12, 15, 16) with antibody-dependent phenomena. Human monocyte-derived macrophages can phagocytize promastigotes but instead of lysis they allow the conversion of promastigotes to an amastigote-like state and support intracellular multiplication (19).

The efficiency of neutrophils, monocytes and eosinophils in the phagocytosis of *L. donovani* without opsonization (7) is in keeping with the small lytic activity observed with these cells in absence of immune serum.

It is possible that our results can be attributed to an increased intracellular destruction of parasites in the presence of antibody as previous described for *T. cruzi* (20, 23). Although *L. donovani* is an obligate intracellular parasit we cannot in our experiments eliminate the possibility of an extracellular killing of parasites.

Acknowledgments

The authors thank to Brazilian National Research Council (CNPq), Brazilian Fund for Science and Technology (FINEP-FUJB B/76/81/120/00), CEPG-UFRJ and NIH (Grant 5R 21 AI 161314-02) for support this work.

References

1. Boyum, A. - Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21:77-89, 1968.
2. Butterworth, A.E.; Sturrock, R.F.; Houba, V. & Ress, P.H. - Antibody-dependent cell mediated damage to schistosomula in vitro. Nature (London), 252:503-505, 1974.
3. Butterworth, A.E.; Sturrock, R.F.; Houba, V.; Mahmoud, A.A.F.; Sher, A. & Ress, P.H. - Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. Nature, 256:727-729, 1975.
4. Butterworth, A.E.; David, J.R.; Franks, D.; Mahmoud, A.A.F.; David, P.H.; Sturrock, R.F. & Houba, V. - Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to ⁵¹Cr-labelled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: damage by purified eosinophils. J. Exp. Med., 145:136-150, 1977.

5. Butterworth, A.E.; Wasson, D.L.; Gleich, G.J.; Loering, D.A. & David, J.K. - Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *J. Immun.*, 122:221-229, 1979.
6. Carvalho, E.M.; Teixeira, R.S. & Johnson Jr., W.D. - Cell-mediated immunity in American visceral leishmaniasis: reversible immunosuppression during acute infection. *Infect. Immun.*, 33:498-502, 1981.
7. Chagn, K.P. - Leishmanicidal mechanisms of human polymorphonuclear phagocytes. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 30:322-333, 1981.
8. Chaves, J. & Ferri, R.G. - Immunoglobulin in visceral leishmaniasis. *Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo)*, 8:225-227, 1966.
9. Fernandes, J.F. & Castellani, O. - Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, 18:195-202, 1966.
10. Kierszenbaum, F. - Antibody-dependent killing of bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* by human peripheral blood leukocytes. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 28:965-968, 1979.
11. Kipnis, T.L.; James, S.L.; Sher, A. & David, J.R. - Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II - Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 30:47-53, 1981.
12. Madeira, E.D.; Andrade, A.F.B.; Bunn-Moreno, M.M. & Barcinsky, M. - Antibody-dependent cellular cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*: characterization of the effector cell from normal human blood. *Infect. Immun.*, 25:34-38, 1979.
13. Manson-Bahr, P.E.C.; Heisch, R.B. & Garnham, P.C.C. - Studies in leishmaniasis in East Africa. IV - The Montenegro test in kala-azar in Kenya. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 53:380-383, 1959.
14. Mayrink, W.; Araújo, F.G. & Magalhães, P.A. - Fluorescent antibody test in visceral leishmaniasis. I - Sensitivity of the test. *Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo)*, 9:172-174, 1967.
15. Nelson, D.L.; Bundy, B.M.; Pitchon, H.E.; Blaese, R.M. & Strober, W. - The effector cells in human peripheral blood mediating mitogen-induced cellular cytotoxicity and antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J. Immun.*, 117:1472-1481, 1976.
16. Nishiya, K. & Horwitz, D.A. - Contrasting effects of lactoferrin on human lymphocyte and monocyte natural killer activity and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *J. Immun.*, 129:2519-2523, 1982.
17. Okabe, K.; Kipnis, T.L.; Galich, V.L.G. & Dias da Silva, W. - Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I - Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to triatomastigote bloodstream forms. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 16:1062-1071, 1980.
18. Olabuenaga, S.E.; Cardoni, R.L.; Segura, E.L.; Riera, N.E. & Bracco, M.M.E. - Antibody-dependent cytolysis of *Trypanosoma cruzi* by human polymorphonuclear leukocytes. *Cell. Immun.*, 45:85-93, 1979.
19. Pearson, R.D.; Romito, R.; Symes, P.H. & Harcus, J.L. - Interaction of *Leishmania donovani* promastigotes with human monocyte-derived macrophages: parasite entry, intracellular survival, and multiplication. *Infect. Immun.*, 32:1249-1253, 1981.
20. Rimoldi, M.T.; Cardoni, R.L.; Olabuenaga, S.E. & Bracco, M.M.E. - *Trypanosoma cruzi*: sequence of phagocytosis and cytotoxicity by human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology*, 42:521-527, 1981.
21. Sanderson, C.J.; Lopes, A.F. & Bunn-Moreno, M.M. - Eosinophils and not K cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature (London)*, 268:340-341, 1977.
22. Sanderson, C.J.; Bunn-Moreno, M.M. & Lopez, A.F. - Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi*: the release of tritium-labelled RNA, DNA and protein. *Parasitology*, 76:299-307, 1978.
23. Sanderson, C.J. & Souza, W. - A morphological study of the interaction between *Trypanosoma cruzi* and rat eosinophils, neutrophils and macrophages "in vitro". *J. Cell. Sci.*, 37:275-286, 1979.
24. Thorne, K.J.I.; Svvennson, R.J. & Franks, D. - Role of hydrogen peroxide and peroxidase in the cytotoxicity of *Trypanosoma dionisi* by human granulocytes. *Infect. Immun.*, 21:798-805, 1978.

FATORES DE VIRULÊNCIA EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÉNICAS PARA SUÍNOS ISOLADAS NO BRASIL

Maria Silvia Viccari Gatti

Marlene Braide Serafim

Antônio Fernando Pestana de Castro

Deptº de Microbiologia e Imunologia

Universidade Estadual de Campinas

13100 Campinas SP, Brasil

José Renaldi Feitosa Brito

Centro Nacional de Pesquisas de Suínos e Aves

Embrapa

Seção de Microbiologia e Imunologia

89700 Concórdia SC, Brasil

& David Emilio Santos Neves de Barcellos

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor

Seção de Patologia Animal

90000 Porto Alegre RS, Brasil

Resumo

Trezentas e vinte e três amostras de *Escherichia coli*, isoladas de suínos com diarréia em Porto Alegre, RS, pertencentes aos sorogrupo 08, 09, 010, 035, 045, 064, 0108, 0115, 0119, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149 e 0157, considerados enteropatogênicos para suínos, foram examinadas quanto à presença de fatores de virulência. A enterotoxina termolábil (LT) foi detectada através do teste de imunohemólise passiva em 56 amostras (17,3%), principalmente nos sorogrupo 08 e 0149, que totalizaram 52 amostras (92,85%) das 56 LT⁺. Amostras pertencentes aos sorogrupo 035, 0141 e 0157 também produziram LT, ao passo que as amostras pertencentes aos demais sorogrupo não produziram esta enterotoxina. A enterotoxina termoestável, detectável pelo teste do camundongo recém-nascido, (STa), foi encontrada em 33 (10,2%) amostras pertencentes aos sorogrupo 09, 064, 0138, 0141 e 0149. Entre as 122 amostras STa⁻, examinadas para a detecção de enterotoxina termoestável, pelo teste de alça ligada de leitão de 6 semanas, (STb), 31 (25,4%) foram positivas e pertenceram aos sorogrupo 035, 064, 0108, 0115, 0119, 0139, 0149 e 0157. Ao que se sabe, é a primeira vez que se relata no Brasil a produção de STb por amostras de *E. coli* de origem suína. Quanto às provas de microhemaglutinação manose-resistente com hemácias de cobaia e cavalo, para a detecção dos抗ígenos K88 e K99, respectivamente, observou-se uma frequência maior de positividade entre as amostras LT⁺. A presença do抗ígeno 987P, também relatado pela primeira vez em nosso país, foi detectado sorologicamente em 12 (8,75%) das 137 amostras examinadas.

Summary

Virulence factors present in strains of porcine enteropathogenic Escherichia coli isolated in Brazil

Three-hundred and twenty-three strains of *Escherichia coli*, isolated from pigs with diarrhea in Porto Alegre, RS, Brazil, belonging to serogroups 08, 09, 010, 035, 045, 064, 0108, 0115, 0119, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149 and 0157, considered as enteropathogenic for swine, were examined for the presence of virulence factors. Thermolabile enterotoxin (LT), as detected by the passive immunehemolysis test was found in 56 (17.3%) strains. Fifty-two (92.85%) out of the 56 LT⁺ strains were serogrouped as 08 and 0149. Strains belonging to serogroups 035, 0141 and 0157 produced also LT whereas strains from the remaining serogroups were LT⁻. Thermostable enterotoxin, as detected by the infant mouse test (STa), was found in 33 (10.2%) strains belonging to serogroups 09, 064, 0138, 0139, 0141 and 0149. Among 122 STa⁻ strains examined for the detection of thermostable enterotoxin by the 6-weeks old ileal loop pig assay (STb), 31 (25.4%) were positive and belonged to serogroup 035, 064, 0108, 0115, 0119, 0139, 0149 and 0157. As far as we know this is the first report on the production of STb by porcine *E. coli* strains in Brazil. With regard to the mannose-resistant microhemagglutination test, carried out with guinea-pig and horse red blood cells, for the detection of K88 and K99 antigens, respectively, a higher frequency of positive tests were observed among LT⁺ strains. The presence of 987P antigen, reported by the first time in our country, was detected serologically in 12 (8.75%) strains out of 137 examined.

Introdução

Nas amostras de *Escherichia coli*, enteropatogênicas para suínos (ECEPS), via de regra são detectados fatores de virulência, representados pela produção de enterotoxinas e presença de抗原s de aderência. As enterotoxinas podem ser de dois tipos: 1) termolábil (LT), de natureza proteica, não dializável, alto peso molecular, imunogênica e muito semelhante à enterotoxina produzida por *Vibrio cholerae* (5, 11, 12, 26); 2) termoestável, de natureza peptídica, baixo peso molecular, dializável, reconhecendo-se pelo menos duas variedades: a) STa, solúvel em metanol, detectável pelo teste do camundongo recém-nascido; STb, insolúvel em metanol, detectável pelo teste de alça ligada de intestino de porco de 5 a 7 semanas, mas inativa no teste do camundongo recém-nascido (1, 6, 9, 11, 13, 17, 22, 27).

Os fatores de colonização, presentes nas amostras de ECEPS, são o K88, K99 e 987P. Destes, os dois primeiros são dotados de atividade hemaglutinante manose-resistente, respectivamente para hemácias de cobaia e de cavalo (15, 16, 18). O antígeno 987P não é hemaglutinante e, ao contrário de K88 e K99, não é codificado por plasmídios (14, 18, 19).

Embora existam vários trabalhos relativos à distribuição destes fatores de virulência, em amostras de ECEPS, isoladas em outros países (11, 13, 16, 18, 19, 22, 23, 24, 27), ao se consultar a literatura nacional sobre o assunto, verifica-se que apenas Simões & col. (21) relatam a ocorrência da produção de enterotoxinas LT e STa, bem como a presença dos抗原s de aderência K88 e K99, em amostras de ECEPS, isoladas de suínos com diarréia. As amostras enterotoxigênicas encontradas foram posteriormente identificadas, sorologicamente, tendo-se verificado que algumas delas não se enquadram no grupo das ECEPS, descritas por Sojka (24).

Tabela 1 - Distribuição da produção de enterotoxinas LT, STa e STb, em sorogrupo de ECEPS^a.

Símbolos: a = *Escherichia coli* enteropatogênica para suínos; b = Número de amostras produtoras de enterotoxina LT em relação ao número total de amostras examinadas dentro de cada sorogrupo; c = Número de amostras produtoras de enterotoxina STa em relação ao número total de amostras examinadas dentro de cada sorogrupo; d = Número de amostras produtoras da enterotoxina STb em relação ao número total de amostras examinadas dentro de cada sorogrupo; e = Amostras não examinadas pelo teste de alça ligada de porco; f = As 4 amostras apresentaram o perfil LT⁺ STa⁺ STb⁻; g = As 11 amostras apresentaram o perfil LT⁺ STa⁻ STb⁺; h = Uma das amostras apresentou o perfil LT⁺ STa⁻ STb⁺

Sorogrupo	Total Examinado ^b LT ⁺	Total Examinado ^b STa ⁺	Total Examinado ^c STb ⁺	Total Examinado ^d (%)	Total de amostras positivas
08	16/22 (72,7%)	0/22 (0%)	NT ^e		16
09	0/8 (0%)	1/8 (12,5%)	0/7 (0%)		1
035	1/19 (5,2%)	0/19 (0%)	2/16 (12,5%)		3
064	0/6 (0%)	2/6 (33,3%)	1/3 (33,3%)		3
0106	0/27 (0%)	0/27 (0%)	2/18 (11,1%)		2
0115	0/3 (0%)	0/3 (0%)	1/3 (33,3%)		1
0119	0/11 (0%)	0/11 (0%)	3/8 (37,5%)		3
0138	0/64 (0%)	13/64 (20,3%)	NT	-	13
0139	0/12 (0%)	1/12 (8,3%)	3/10 (30,0%)		4
0141	1/76 (1,3%)	12/76 (15,7%)	NT	-	13
0149	36/38 (94,7%)	4/38 ^f (10,5%)	11/34 ^g (32,3%)		36
0157	2/25 (8,0%)	0/25 (0%)	8/23 ^h (37,7%)		9
Total	56/323 (17,33%)	33/323 (10,21%)	31/122 (25,40%)		104

No presente estudo, houve uma inversão da metodologia, isto é, amostras de *E. coli*, isoladas de suínos com diarréia, foram inicialmente identificadas sorologicamente (24), procedendo-se, posteriormente, a pesquisa dos fatores de virulência, nas amostras classificadas como ECEPS. Por outro lado, a pesquisa da produção de enterotoxina STb, bem como do antígeno de aderência 987P não havia sido feita anteriormente em amostras de ECEPS, isoladas no Brasil.

Material e Métodos

Amostras - Foram examinadas 323 amostras de *Escherichia coli*, isoladas de suínos com diarréia, em Porto Alegre, RS, entre setembro de 1979 e março de 1981. Todas as amostras foram classificadas, sorologicamente, de acordo com esquema proposto por Sojka (24), sendo enquadradas nos sorogrupo considerados enteropatogênicos para suínos.

Como controles positivos da produção de enterotoxina LT e STa, foram utilizadas, respectivamente, as amostras de *E. coli* 40T, sorotipo 078:H12 (L.R. Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, São Paulo SP, Brasil) e *E. coli* 3, sorotipo 0128ac:H21 (25), isolado de um caso de diarréia em Campinas. Como controle positivo para a produção de STb, foi usada a amostra de *E. coli* 1790 (H.W. Moon, National Animal Disease Lab., Ames, Iowa, USA). Como controle negativo, não enteropatogênico, foi usada a amostra de *E. coli* K12/711 (Nal), (W.K. Maas, University of New York, USA). Na obtenção de anticorpos específicos contra os抗ígenos de aderência, foram utilizadas, a saber: a) Para o preparo do antisoro K88 - Amostra O-K88ac:H68 (P.A.M. Guinée, Rijks Institut voor de Volksgezondheid, Bilthoven, Netherlands); b) Para o preparo do antisoro K99 - Amostras K12/711 pro, his, trip, fen; K99⁺ e K12:99⁺.

(N.P. Silva, Escola Paulista de Medicina, São Paulo SP, Brasil); c) Para o preparo do antisoro 987P - Amostras 1592, sorogrupo 09:K103:987P⁺ e sua variante 987P- (H.W. Moon, National Animal Disease Laboratory, Ames, Iowa, USA).

Todas as amostras foram mantidas em meio de Lignières, à temperatura ambiente, e a -70°C, em meio de infusão de cérebro e coração (BHI, Difco, Laboratories) adicionando-se 15% de glicerina, após o cultivo (7).

Preparo das enterotoxinas - Para a detecção das enterotoxinas LT, STa e STb, foram utilizados os sobrenadantes de culturas em meio de "Casamino-Acids-Yeast-Extract (CAYE)" (7), incubadas a 37°C, durante 24hs, em estufa com agitação (150rpm). Os sobrenadantes, a serem utilizados na pesquisa de enterotoxina LT, foram obtidos de culturas processadas da maneira descrita acima, exceto que, antes da centrifugação, ao cultivo de cada amostra foi adicionado 1ml de polimixina B, diluída em tampão fosfato 0,04M, pH 6,7, na concentração final de 0,22mg da droga por ml de meio. As culturas foram então reincubadas a 37°C, com agitação, por 15 minutos adicionais para, em seguida, serem centrifugadas a 5000rpm, por 30 minutos.

Deteção das enterotoxinas LT, STa e STb - O teste da imunohemólise passiva (IHP), para a detecção de enterotoxina LT, foi realizado de acordo com o descrito por Serafim & col. (20), com as modificações propostas por Castro & col. (4), que consistiram, basicamente, em se utilizar como diluente nessa reação, ao invés de tampão fosfato (0,04M, pH 6,7), recomendado na técnica original, o tampão veronal, adicionado de íons cálcio e magnésio.

A pesquisa da enterotoxina STa foi feita através da técnica do camundongo recém-nascido (6, 17). Foram considerados como positivos valores iguais ou superiores a 0,085, para a relação peso dos intestinos sobre peso das carcaças dos camundongos inoculados, com uma determinada preparação. Para a pesquisa de enterotoxina STb, foi utilizado o método da alça ligada do intestino de porco (ALIP) de 6 semanas (13), com ligeiras modificações, sendo que apenas amostras STa⁺ foram examinadas por esta técnica. Leitões, de 6 semanas, da raça Landrace, foram mantidos em jejum 24hs antes da operação, fornecendo-se apenas água "ad libitum". Após tricotomia da pele da parede abdominal, os animais foram anestesiados, por inalação com éter, procedendo-se, em seguida, à assepsia, com mertiolato (tintura 1:10.000) da região, realizando-se a laparatomia, ao longo da linha alba. Após a exposição do intestino delgado, este foi lavado intra-luminalmente com solução fisiológica estéril, ligeiramente aquecida, esvaziando-se o conteúdo fecal com cuidado. Realizou-se, em seguida a ligadura das alças intestinais, da parte anterior do intestino delgado. Para cada animal foi feito um total de 15 a 17 alças de 10cm, nas quais foram inoculados 2ml de sobrenadante de cultura por alça. Na técnica original (13), o volume de sobrenadante, injetado por alça, foi cinco vezes superior, ou seja, para uma alça de 10cm, foi utilizado um inóculo de 10ml de sobrenadante. Dezenas horas após a inoculação os animais foram eletrocutados com uma corrente de 220 volts e as alças examinadas para a presença de dilatação, calculando-se, para cada alça, a relação volume de líquido acumulado (ml) por comprimento de alça (cm). Com base nos resultados médios, obtidos com controles positivos e negativos, valores iguais ou superiores a 0,7 foram considerados positivos. Para cada sobrenadante em exame, os ensaios foram realizados em três animais.

Deteção de fatores de colonização - Para a detecção do antígeno K88, as amostras de *E. coli* foram cultivadas em ágar glicose fosfatado (15). Culturas a serem examinadas, quanto à presença do antígeno K99, foram semeadas em meio de Minca (10) e aquelas a serem testadas quanto à presença do antígeno 987P, foram cultivadas em ágar sangue (19). Todos os meios foram incubados a 37°C, por 24hs. Com suspensões bacterianas padronizadas (15), preparadas a partir dos cultivos realizados como descrito acima, foram feitas provas de microhemaglutinação manose-resistente (MHMR) (15, 21), utilizando-se, para tal, hemácias de cobaia e de cavalo, respectivamente, para a pesquisa presuntiva do antígenos K88 e K99 (15, 16). Posteriormente, as amostras hemaglutinantes foram examinadas através de provas de soroaglutinação em lâmina, com antisoros específicos para os antígenos K88 e K99, preparados conforme descrito por Simões & col. (21). A pesquisa de amostras de *E. coli* portadoras do

antígeno 987P, não hemaglutinante, realizada entre 137 amostras escolhidas ao acaso e pertencentes a todos os grupos estudados, foi feita unicamente através de provas de soro-aglutinação em lâmina, obedecidos os critérios de seleção de colônias pilosas, recomendados por Nagy & col. (19). Em todos os testes de aglutinação em lâmina, para a pesquisa destes抗igenos de aderência, foram incluídos, como controles positivo e negativo das reações, suspensões concentradas de amostras portadoras e não portadoras dos fatores de colonização pesquisados, citadas anteriormente e que também foram usados no preparo dos antisoros específicos (21).

Tabela 2 - Correlação entre a produção de enterotoxinas (LT, STa e/ou STb), provas de microhemaglutinação manose-resistente e a presença de抗igenos de aderência K88 e K99 identificados através de provas de soroaglutinação em lâmina.

Símbolos: a = STb^{nt} amostras não testadas no teste de alça ligada de porco; b = Porcentagem de amostras positivas nos testes de MMR, realizados com hemácias de cobaia e cavalo, em relação ao nº total de amostras examinadas; c = Os números entre parênteses representam amostras que reagiram na prova de soroaglutinação em lâmina com antíssoro específico anti-K88, dentre aquelas que aglutinaram com hemácias de cobaia. d = Os números entre parênteses representam amostras que reagiram na prova de soroaglutinação em lâmina com antíssoro específico anti-K99, dentre aquelas que aglutinaram com hemácias de cavalo

	Número de amostras MMR				Número total de amostras				Total	
	LT ⁺		LT ⁻		LT ⁺		LT ⁻		Nº +/nº total	% de amostras
Perfil enterotoxigênico	STa ⁺ STb ^{nt} ^a	STa ⁺ STb ⁺	STa ⁻ STb ^{nt} ^a	STa ⁻ STb ⁻	STa ⁺ STb ^{nt} ^a	STa ⁺ STb ⁺	STa ⁻ STb ^{nt} ^a	STa ⁻ STb ⁻	Nº +/nº total	
Microhemaglutinação com:									% de amostras	
Hem. cobaia-	3/4 (1) ^c	9/10 (3)	13/20 (7)	12/22 (6)	2/29 (1)	5/21	22/150 (6)	11/65 (3)	77/321 (27)	23,98
Hem. cavalo	0/4	5/10 (1) ^d	3/20 (1)	2/22 (1)	0/29	1/21 (0)	4/150 (1)	1/65 (0)	18/321 (4)	5,60

Resultados

Produção de enterotoxina - As amostras enquadradas nos sorogrupo 010 (três amostras); 045 (oito amostras) e 0147 (uma amostra) não produziram nenhuma das enterotoxinas pesquisadas (dados não mostrados em tabela). Na Tabela 1, encontram-se representados, para cada sorogrupo, o número de amostras de *E. coli* examinadas em relação à produção de enterotoxina LT, detectável pelo teste da IIP. Verifica-se que, das 323 amostras estudadas, 56 (17,3%) produziram esta toxina, sendo que a maioria dos resultados positivos esteve incluída entre as amostras dos sorogrupo 08 e 0149, totalizando 52 amostras enterotoxigênicas, que corresponderam a 92,85% das amostras LT⁺ de todos os sorogrupo examinados. As outras quatro amostras (7,15%) estão incluídas no sorogrupo 035 (uma amostra), 0141 (uma amostra) e 0157 (duas amostras, não tendo sido verificada a produção desta enterotoxina em amostra de sorogrupo 09, 064, 0108, 0115, 0119, 0138 e 0139).

A produção de enterotoxina STa foi detectada em 33 (10,2%) das 323 amostras examinadas (Tabela 1). Percentualmente, a maior parte das amostras STa⁺ foi verificada entre os sorogrupo 064, 0138 e 0141, tendo também sido observada a produção de STa nos sorogrupo 09 (uma amostra), 0139 (uma amostra) e 0149 (quatro amostras). Não foram encontradas amostras STa⁺ entre os sorogrupo 08, 035, 0108, 0115, 0119 e 0157.

Na Tabela 1, encontram-se ainda os resultados do teste de ALIP, utilizado na detecção da enterotoxina STb. Conforme critério previamente estabelecido, de se excluir apenas amostras STb⁻ foram estudadas 122 amostras, das quais 31 (25,4%) foram positivas neste teste, cujos valores da reação volume de líquido/comprimento de alça (VL/CA) variaram entre 0,76 a 3,5. As amostras STb⁺ encontradas foram enquadradas nos sorogrupo 035, 064, 0108, 0115, 0119, 0139, 0149 e 0157. Na Figura 1, é mostrado o teste de ALIP, realizado com culturas positivas e negativas para a produção de STb.

Tabela 3 - Amostras K88⁺ de ECEPS^a que reagiram no teste de soroaglutinação com antisoro específico anti-K88 e seus respectivos perfis enterotoxigênicos.

Símbolos: a = *Escherichia coli* enteropatogênica para suínos; * = Os valores entre parênteses representam o número de amostras encontradas dentro do respectivo perfil enterotoxigênico

Sorogrupo	Total examinado	Perfil
08	7/18	LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} (6) LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻ (1)
0108	2/7	LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} (1) LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻ (1)
0138	2/8	LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} (2)
0139	1/8	LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} (1)
0141	2/11	LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} (2)
0149	13/25	LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻ (6) LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} (1) LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻ (1) LT ⁺ STa ⁻ STb ⁺ (3) LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻ (2)

Tabela 4 - Amostras K99 de ECEPS^a que reagiram no teste de soroaglutinação com antisoro específico anti-K99 e seus respectivos perfis enterotoxigênicos

Símbolos: a = *Escherichia coli* enteropatogênica para suínos; * = Os valores entre parênteses representam o número de amostras encontradas dentro do respectivo perfil enterotoxigênico

Sorogrupo	Total examinado	Perfil
0138	1/3	LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt}
0149	3/9	LT ⁺ STa ⁻ STb ⁺ LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻

Tabela 5 - Amostras 987P⁺ de ECEPS^a que reagiram no teste de soroaglutinação em lâmina com antisoro específico anti-987P e seus respectivos perfis enterotoxigênicos.

Símbolos: a = *Escherichia coli* enteropatogênica para suínos; * = Os valores entre parênteses representam o número de amostras dentro do respectivo perfil enterotoxigênico

Sorogrupo	Total examinado	Perfil
09	1/2	LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻
0115	1/3	LT ⁺ STa ⁻ STb [*]
0141	7/49	LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻ (6)* LT ⁺ STa ⁻ STb ^{nt} (1)
0149	2/36	LT ⁺ STa ⁻ STb ⁺ (1) LT ⁺ STa ⁻ STb ⁻ (1)
0157	1/7	LT ⁺ STa ⁻ STb ⁺

Correlação entre MHMR e a produção de enterotoxina LT, STa e STb - Levando-se em consideração que: a) não nos preocupar em detectar a enterotoxina STb em amostras que já haviam sido positivas no teste do camundongo recém-nascido, haja vista que esta positividade já era uma indicação de enteropatogenicidade e b) nos era impossível tecnicamente, realizar o teste de ALIP em todas as amostras por nós pesquisadas, selecionamos para serem estudados por este teste algumas amostras que haviam sido negativas para STa e que pertenciam aos sorogrupo já descritos na literatura como produtores de STb (13, 18), ou sejam 08, 09, 064, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149 e 0157. Algumas amostras, pertencentes a outros sorogrupo (035, 0108, 0115 e 0119) não descritos como produtores de STb, foram também incluídas, para fins comparativos.

Assim sendo, ao examinarmos o perfil de enterotoxigenicidade das amostras estudadas, além das possíveis combinações entre LT, STa e STb, são encontrados agrupamentos de amostras onde aparece a designação STbnt, relativa às amostras não examinadas, pelos critérios já expostos.

Na Tabela 2, estão representados os números de amostras dentro de cada perfil de enterotoxigenicidade e os respectivos resultados observados nas provas de MHMR, usando hemácias de cobaia e de cavalo. Podemos verificar que o maior número de testes positivos de MHMR ocorreu com hemácias de cobaia, com predomínio de amostras LT⁺, ou seja, entre 56 amostras produtoras desta enterotoxina 37 (66,73%) foram positivas do teste de MHMR. Por outro lado, nas amostras não produtoras de LT, das 265 examinadas apenas 40 (15,09%) foram capazes de aglutinar hemácias de cobaia na presença de D-manoze.

Embora o número de testes de MHMR positivos para hemácias de cavalo tenham sido inferior ao observado com as hemácias de cobaia, podemos verificar na Tabela 2, que a frequência de provas de MHMR positivas para hemácias de cavalo foi significativamente maior entre as amostras LT⁺, isto é, das 56 amostras com esta característica 10 (17,85%) foram capazes de aglutinar hemácias de cavalo, ao passo que apenas 6 (2,26%) das 265 amostras LT⁻ mostraram atividade hemaglutinante.

Ao analisar, agora, na Tabela 2, a presença dos抗igenos K88 e K99, detectados através de provas de soroaglutinação em lâmina, observa-se que nem todas as amostras positivas no teste de MMR com hemácia de cobaia aglutinaram frente ao antisoro K88. Assim sendo, das 37 amostras LT⁺ MHMR⁺, apenas 17 (45,9%) demonstraram possuir o抗igeno K88. Com relação às amostras LT⁻, das 40 MHMR⁺ com hemácias de cobaia, 10 (25%) foram K88⁺.

Das 10 amostras LT⁺ MHMR⁺ com hemácias de cavalo, três (30%) aglutinaram frente ao antisoro K99, enquanto das seis amostras LT⁻, apenas uma (16,6%) aglutinou frente a este antisoro (Tabela 2). Os perfis enterotoxigênicos das amostras K88⁺, identificadas por provas de soroaglutinação, e respectivos sorogrupos a que pertenceram encontram-se na Tabela 3. A única amostra K99⁺, do sorogrupo 0138, apresentou o perfil enterotoxigênico LT⁺ STA⁻ STb^{nt}. As três amostras K99⁺ do sorogrupo 0149 apresentaram, respectivamente, os perfis LT⁺ STA⁻ STb⁺; LT⁺ STA⁻ STb^{nt} e LT⁻ STA⁻ STb⁻ (Tabela 4).

Das 137 amostras escolhidas ao acaso, entre todos os sorogrupos estudados, 12 (8,75%) foram positivas no teste de soroaglutinação em lâmina, para o抗igeno 987P, conforme mostra a Tabela 5, onde encontram-se apenas os resultados positivos. Pode-se verificar que apenas uma das amostras, pertencentes ao sorogrupo 0141, produziu a enterotoxina STA.

Discussão

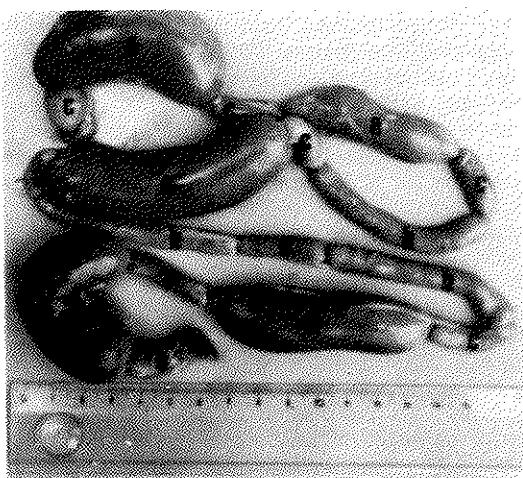
Entre os sorogrupos de ECEPS estudados neste trabalho, a produção de enterotoxina LT foi detectada apenas nos sorogrupos 08, 035, 0141, 0149 e 0157, causando surpresa o fato de não serem encontradas amostras LT⁺ nos sorogrupos 0145, 0138 e 0147 já relatados anteriormente como produtores desta enterotoxina (2, 21, 22, 23). Com relação a este aspecto, embora todas as amostras que nos foram enviadas tivessem sido examinadas, tão logo quanto possível, é importante lembrar que, alguns dos últimos sorogrupos citados, podem diferir dos anteriores, em especial 08 e 0149, quanto à maior instabilidade da manutenção do plasmídio responsável pela síntese dessa enterotoxina, à semelhança do que ocorre com algumas amostras de origem humana (7).

A produção de enterotoxina STA, pelos sorogrupos 09, 064, 0138, 0139, 0141 e 0149 (Tabela 1), tem sido relatada por vários autores (17, 18, 23, 27). Nossos resultados foram semelhantes e, embora o número de amostras estudadas, no sorogrupo 064, tenha sido relativamente pequeno, este sorogrupo apresentou maior frequência (33%) de amostras STA⁺, em relação aos demais sorogrupos, onde a porcentagem de amostras positivas variou entre 8,3% e 20,3%.

A produção simultânea de LT e STA tem sido relatada como frequente em amostras dos sorogrupos 0141 e 0149 (23). Enquanto entre amostras do sorogrupo 0149 foi observada uma frequência maior de colibacilos produtores de LT, estes foram mais raros nas 76 amostras do sorogrupo 0141, mostrando que, talvez, neste sorogrupo esta característica não seja muito estável.

Ao se fazer uma análise dos sorogrupos por nós estudados, que deixaram de produzir as enterotoxinas LT e/ou STA, vê-se que amostras pertencentes aos sorogrupos 010, 045, 0108, 0115, 0119 e 0147 não produziram nenhuma destas enterotoxinas. Em-

Figura 1 - Teste de alça ligada de porco realizado com sobrenadantes de culturas de *Escherichia coli* positivas (a) e negativas (b) para a produção da enterotoxina termoestável STb. As inter alcas, não inoculadas estão designadas pela letra c.



bora, em alguns destes sorogrupos, esta afirmação possa ter ficado prejudicada em virtude do baixo número de amostras examinadas, não se pode omitir o fato de que estes sorogrupos, em conjunto, representaram 53 amostras que, segundo Sojka (24) e Smith & Halls (22), estão incluídas entre as ECEPS, cujos sobrenadantes de culturas são capazes de dar um teste de ALIP positivo, indicando a produção de enterotoxina STb. De fato, os resultados, por nós obtidos, com algumas destas amostras, revelaram aspectos interessantes que vieram, ainda que parcialmente, explicar porque, em não produzindo LT e/ou STA, amostras dos sorogrupos 010, 0108, 0115 e 0119 poderiam ser consideradas como ECEPS. Em trabalho anterior, Gyles (13) demonstrou que amostras dos sorogrupos 08, 09, 064, 0138, 0139, 0141, 0147, 0149 e 0157 eram capazes de produzir a enterotoxina STb, o que foi também por nós confirmado, para alguns destes sorogrupos (Tabela 1). Ainda com relação à produção de STb, pareceu importante sua alta frequência, ou seja: entre 122 amostras, nada menos do que 31 (25,4%) produziram esta enterotoxina, sugerindo que a mesma desempenhe um papel relevante na etiologia da diarréia suína.

As amostras dos sorogrupos 0119, 0115 e 064 foram as que apresentaram maior frequência de produção de STb, respectivamente 37,5%, 33,3% e 33,3%, embora em dois deles, ou seja, 064 e 0115 tenham sido examinadas apenas três amostras de cada (Tabela 1).

As amostras dos sorogrupos 0149 e 0157 apresentaram alta frequência de produção de STb e no caso particular do sorogrupo 0149, todas as 11 amostras STb⁺ produziram também LT.

No sorogrupo 0157, embora a frequência de amostras STb⁺ também tenha sido alta, apenas 1 das 8 amostras STb⁺ produziu LT. Segundo Gyles (comunicação pessoal), existem evidências de que a produção simultânea de LT e STb possa ser codificada por um mesmo plasmídio, o que, de acordo com os nossos resultados, seria válido talvez apenas para as amostras do sorogrupo 0149, isto é, amostras deste sorogrupo que produziram STb produziram também LT. O reverso, entretanto, não ocorreu, pois, 25 outras amostras deste sorogrupo produziram, apenas LT. Entre estas últimas, quatro produziram também STA e não foram examinadas quanto a produção de STb.

Os resultados das provas de MHMR e sua correlação com a produção de enterotoxina mostrados na Tabela 2, permitem verificar que, entre 37 amostras LT⁺, que foram capazes de aglutinar hemácias de cobaia no teste de MHMR, apenas 17 (45,94%) tiveram a presença do antígeno K88 confirmada sorologicamente. Estes dados sugerem a possibilidade de existirem outros抗ígenos de aderência diferentes, antigenicamente, de K88 e que seriam também capazes de aglutinar hemácias de cobaia, à semelhança do que ocorre com o antígeno F41, recentemente descrito (3). A observação de que, em amostras LT⁺, também foi encontrado o antígeno K88, não colide com outros relatos da literatura (3, 21, 23).

Uma associação interessante, e que deve ser comentada em detalhe, foi observada com o fenótipo LT⁺ STA⁻ STb⁺, onde entre 10 amostras, 9 foram capazes de aglutinar hemácias de cobaia (Tabela 2), das quais 3 (33,3%), possuíam o antígeno K88. Estes achados podem significar que, nas amostras em questão, o antígeno K88 seja a adesina que permite a ação da enterotoxina STb a nível da luz intestinal nos animais infectados por amostras de ECEPS STb⁺.

Os resultados obtidos, nos testes de MHMR com hemácias de cavalo, discordam daqueles obtidos por Simões & col. (21), pois não foi observada a associação K99⁺ STA⁺ que, provavelmente, é uma característica apenas das amostras dos sorogrupos 0101 (10, 16, 18, 21). Nesta investigação este sorogrupo não foi estudado e, entre os diferentes fenótipos, nos quais foi constatada a produção de STA, nenhuma das 33 amostras, neles enquadradas, foi capaz de aglutinar hemácias de cavalo (Tabela 2). Por outro lado, entre 56 amostras LT⁺, 10 foram capazes de aglutinar hemácias de cavalo, das quais três foram K99, sendo que, em pelo menos uma delas, pertencente ao sorogrupo 0149, a produção de STb foi confirmada (Tabela 4). Seria, portanto, admissível supor-se também a participação do antígeno K99, na viabilização da atividade diarréogênica desta enterotoxina.

O antígeno 987P foi detectado em 12 amostras, enquadradas nos sorogrupos 09, 0115, 0141, 0149 e 0157, sendo interessante notar que, ao contrário do relatado na literatura (8), com exceção de uma amostra, pertencente ao sorogrupo 0141, a associação 987P e STA não foi observada.

Concluindo, os estudos realizados com 323 amostras de ECEPS, isoladas no Rio Grande do Sul, tendo como objetivo determinar a distribuição dos fatores de virulência presentes em amostras suínas, embora tenham confirmado, em grande parte, dados relatados na literatura internacional, é esta a primeira pesquisa que se faz no Brasil, com grande número de amostras, previamente classificadas sorologicamente (24), incluindo todos os fatores de virulência até agora descritos para as amostras de *E. coli* de origem suína. Alguns aspectos relevantes foram a produção de STb, descrita pela primeira vez no Brasil, por amostras dos sorogrupo 035, 064, 0108, 0115, 0119, 0139, 0149 e 0157, em especial no que concerne ao sorogrupo 0119 (dados não publicados), com relação ao qual ainda não haviam sido descritas amostras STb⁺. Finalmente, é também a primeira vez que se identifica a presença do antígeno 987P, em amostras de ECEPS isoladas no Brasil.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Os autores agradecem a Sra. Amélia Rosa Monteiro pela realização dos testes sorológicos para a identificação do antígeno 987P.

Referências Bibliográficas

1. Burgess, M.N.; Bywater, R.J.; Cowley, C.M.; Mullan, N.A. & Newsome, P.M. - Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable, *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves. *Infect. Immun.*, 21:526-531, 1978.
2. De Boy III, J.M.; Wachsmuth, I.K. & Davis, B.R. - Serotypes of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated in the United States. *Infect. Immun.*, 29:361-368, 1980.
3. De Graaf, F.K. & Roorda, I. - Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from the calf enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infec. Immun.*, 36:751-753, 1982.
4. Castro, A.F.P. de; Serafim, M.B.; Gomes, Y.A. & Gatti, M.S.V. - Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 12:714-717, 1980.
5. Clements, J.D. & Finkelstein, R.A. - Immunological cross-reactivity between heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and sub-units of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Infect. Immun.*, 21:1036-1039, 1978.
6. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Willians, R.E. & Hardem, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1973.
7. Evans Jr., D.J.; Evans, D.E.; Dupont, H.L.; Ørskov, F. & Ørskov, I. - Patterns of loss of enterotoxigenicity by *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: suggestive evidence for an interrelationship with serotype. *Infect. Immun.*, 17:105-111, 1977.
8. Gaastra, W. & De Graaf, F.K. - Host-specific fimbrial adhesins of non-invasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.*, 46:129-171, 1982.
9. Greenberg, R.N. & Guerrant, R.L. - *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Pharmac. Ther.*, 13:507-531, 1981.
10. Guinnée, P.A.M.; Veldkamp, J. & Jansen, W.W. - Improved Minca medium for the detection of K99 antigen in calf enterotoxigenic strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 15:676-678, 1977.
11. Gyles, C.L. & Barnum, D.A. - *Escherichia coli* in ligated segments of pig intestine. *J. Path. Bact.*, 94:189-194, 1967.
12. Gyles, C.L. - Relationship among heat-labile enterotoxins of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J. Infect. Dis.*, 129:277-283, 1974.
13. Gyles, C.L. - Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *Can. J. Comp. Med.*, 43:371-379, 1979.

14. Isaacson, R.E. & Richter, P. - *Escherichia coli* 987P pillus: purification and partial characterization. *J. Bact.*, 146:784-789, 1981.
15. Jones, G.W. & Rutter, J.M. - The association of K88 antigens with hemagglutinating activity of porcine strains of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, 84:135-144, 1974.
16. Moon, H.W.; Nagy, B.; Isaacson, R.E. & Ørskov, I. - Occurrence of K99 antigen on *Escherichia coli* isolated from pigs and colonization of pig ileum by K99 enterotoxigenic *Escherichia coli* from calves and pigs. *Infect. Immun.*, 15:614-620, 1977.
17. Moon, H.W.; Yorg, P.Y.; Whipp, S.C. & Isaacson, R.E. - Effects of age and ambient temperature on the response of infant mice test to heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*: assay modification. *Infect. Immun.*, 20:36-39, 1978.
18. Moon, H.W.; Kohler, E.M.; Schneider, R.A. & Whipp, S.C. - Prevalence of pillus antigens, enterotoxins types and enteropathogenicity among K88 negative enterotoxigenic *Escherichia coli* from neonatal pigs. *Infect. Immun.*, 27:222-230, 1980.
19. Nagy, B.; Moon, H.W.; Isaacson, R.E. - Colonization of porcine intestine by enterotoxigenic *Escherichia coli*: selection of pilated forms "in vivo", adhesion of pilated forms to epithelial cells "in vitro" and incidence of a pilus antigen among porcine enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infec. Immun.*, 16:344-352, 1977.
20. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Reis, M.H.L. dos & Trabulsi, L.R. - Passive immune hemolysis for the detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 26:606-610, 1979.
21. Simões, M.O.; Castro, A.F.P. de & Serafim, M.B. - Mannose-resistant haemagglutination and colonization factors among *Escherichia coli* strains isolated from pigs. *Vet. Rec.*, 26:275-278, 1981.
22. Smith, H.W. & Halls, S. - Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Path. Bact.*, 93:531-543, 1967.
23. Söderlind, O. & Möllby, R. - Enterotoxins, O-groups and K88 antigen in *Escherichia coli* from neonatal pigs with and without diarrhoea. *Infect. Immun.*, 24:611-616, 1979.
24. Sojka, W.J. - *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Review series n°7. Commonwealth Bureau of Animals Health, Weibridge, 1965.
25. Reis, M.H.L. dos; Matos, D.P.; Castro, A.F.P. de; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Relationship among enterotoxins, phenotypes, serotypes and sources of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 28:24-27, 1980.
26. Takeda, Y.; Honda, T.; Sima Huilan, T.T. & Miwatani, T. - Analysis of antigenic determinants in cholera enterotoxin and heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 41:50-53, 1983.
27. Whipp, S.C.; Moon, H.W. & Argenzio, R.A. - Comparison of enterotoxin activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and class 2 *Escherichia coli* of swine origin. *Infect. Immun.*, 31:245-151, 1981.

AN OUTBREAK OF TYPE C BOTULISM IN BROILER CHICKENS IN SÃO PAULO STATE, BRAZIL

Ruben Pablo Schocken-Iturrino
Fernando Antonio de Ávila

Deptº de Microbiologia
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal
Unesp
Campus de Jaboticabal
14870 Jaboticabal SP, Brasil

José Eduardo Pinese
Fatec Química Industrial S.A.
Praça da Liberdade, 130
01503 São Paulo SP, Brasil

& Fumio Yokoya
Deptº de Ciências de Alimentos Unicamp
Cidade Universitária
13100 Campinas SP, Brasil

Summary

An outbreak of type C botulism involving 12,000 seven-week old broiler chickens is described. No direct source of toxin was found. Toxin of *C. botulinum* type C was demonstrated in sera and in gizzard, crop and intestine washings from broilers with botulinal symptoms. Extracts of these tissues produced fatal toxemia of mice in 12 hours. The lethal toxin was specifically neutralised by *C. botulinum* type C antitoxin and was inactivated by heating to 100°C for 10 minutes. After removing the carcasses and disinfecting the sheds, no more deaths occurred. Botulism by toxin type C is strongly suspected as the cause of death.

Resumo

Surto de botulismo C em frangos no Estado de São Paulo, Brasil

Um surto por botulismo tipo C acometeu 12.000 frangos de sete semanas de idade no Estado de São Paulo. A fonte direta de toxina não foi detectada. Toxina de *Clostridium botulinum* tipo C foi demonstrada no soro de aves vivas e nos extratos do conteúdo do "papo", moela e intestinos de aves com sintomas de botulismo. Estes extratos provocaram toxemia letal para camundongos em 12 horas. A toxina foi especificamente neutralizada pela antitoxina de *C. botulinum* tipo C e inativada pelo aquecimento a 100°C por 10 minutos. Depois da retirada das carcaças e a desinfecção dos galpões não ocorreram mais mortes. Toxina botulínica do tipo C é considerada como principal suspeita das mortes.

Introduction

The vast majority of the cases of botulism in Brazil have been provoked by *Clostridium botulinum* types C and D, attacking principally bovines with mineral deficiency, which makes them eat bones (Osteofagy) (3, 7, 13).

In 1976, Saraiva (10) showed the presence of *C. botulinum* type C in hens in the region of Rio Grande do Sul, having as its cause the consumption of contaminated ration. In 1960, Jeffman (5) reported the presence of *C. botulinum* type A in canned fish. In Ceará, Brazil *C. botulinum*, types A, B, C and F, were isolated in marine sediments (14).

In birds, botulism attacks principally ducks and other wild waterfowl. The most frequently responsible agent is *C. botulinum* type C which probably develops in the carcasses of small invertebrates, being, swallowed thereafter by the migratory birds, together with the toxin (4, 6, 8). Botulism in wild birds and in broiler chickens has been reported in recent years in Great Britain, the United States and Europe (1, 2, 4, 11).

The purpose of this paper is to draw attention to the occurrence of botulism in this country.

Material and Methods

The outbreak occurred in March, 1983, in São José do Rio Preto, State of São Paulo, Brazil, on a farm with 80.000 birds in twelve sheds, with approximately seven thousand birds in each one.

There was no history of disease resembling botulism, and the birds had been vaccinated against Newcastle disease virus. They were fed with meal rations produced on the farm consisting of corn, bones and meat meal. The supply of water was stagnant.

The first signs of disease appeared when the broilers were 6 to 7 weeks old, after the holidays of carnival, with high mortality of birds. During this period, the carcasses of birds that died by no specific causes (nearly 2%, which is considered normal), were not removed from the sheds. Clinical signs ranged from complete flaccid paralysis of limbs and neck to drowsiness and loss of mobility caused by wing and leg weakness. The feathers became ruffled and were easily removed. Eyelid paralysis was present. The head was distended to the front, with the beak resting on the floor. The birds did not eat nor drink water and died 3 to 4 hours after the symptoms were observed. The carcasses decomposed rapidly. On "post-mortem" examination undertaken in the Instituto Biológico of Descalvado, SP, no other cause of death was suspected. Material was also sent to the pathology laboratory of Merck, Sharp & Dohme in Valinhos SP, where botulism was suspected.

The material was analyzed in our laboratory in Jaboticabal. The crops contained a small amount of clear fluid, some grit and pieces of maggots. The gizzards contained a dark grit, ration, fibre and small pieces of hay, perhaps litter. The contents of the small intestine were scanty. The birds were in good condition, with no significant lesions in the internal organs. After the removal of all carcasses and litter, a careful cleaning and disinfection, no more death occurred. (The sheds were washed with copper sulphate solution and disinfected with orthodichlorobenzene).

a) Confirmation of diagnosis - One half ml of serum from each bird brought to the laboratory was inoculated intraperitoneally (ip) into each of four mice. Two other mice received 0,5ml of the serum but after heating by 10 minutes at 100°C. Mouse inoculation tests were repeated but with serum neutralised with botulinal antitoxin types C and D from the Institut Pasteur (Paris).

b) The toxin - Samples of the contents of the crop, gizzard, intestines and pieces of liver, feces and feed, were extracted separately at 4°C with 0.2M gelatin-phosphate buffer (pH 6.5) to determine whether the toxin was present. After extraction for 12 hours, the supernatant was centrifuged at 4°C at 12000 x g for 20 minutes and samples of 0.5ml injected intraperitoneally into mice, according to Smith (12).

c) *C. botulinum* - Samples of 4g of feed and washings of crop, gizzard and intestine content, together with liver and feces, were examined separately for the presence of *C. botulinum* by enrichment in cooked meat medium (Difco), submitted to a thermal shock at 80°C for 10 minutes, and cooled with tap water, then incubated at 35°C for five days. The supernatant was centrifuged free of debris and most bacterial cells, diluted 1:5 with gelatin-phosphate buffer containing chloramphenicol 1,2mg/mouse (to minimise non-specific deaths), and injected (ip), into mice which had previously received tetanus antitoxin (Syntex, Pinheiros) and observed for botulism symptoms or death (12). The sediment from each culture was surface spread on reinforced clostridial agar (Oxoid), incubated under anaerobic conditions with the gas-pak system (BBL) in anaerobic jars and incubated at 30°C for 3 days. These were then observed for the presence of *C. botulinum* colonies as described by Smith (12).

Results

The data in Table 1 shows that all the mice injected with the samples of untreated broilers serum died after 12 hours with typical symptoms of botulism, while the mice inoculated with material denatured by heating at 100°C survived.

We observe in this table that, in the mouse neutralisation test, the animals injected with material previously neutralised with botulinal antitoxin type C survived, while the animals injected with serum neutralised with antitoxin type D died with clinical symptoms of botulism.

The clarified extracts of the contents of crop, gizzard, intestines and feces, when injected without treatment, caused the death of all mice, with the symptoms of botulism, except for the extracts obtained from the liver and ration. The antitoxins of *Clostridium botulinum* types A, B, D and E failed to neutralise the toxic extracts.

The samples of the crop, gizzard and intestine contents, when applied to an enrichment medium, exhibited growth of clostridia, with presence of anaerobic rods having subterminal spores. When this material was centrifuged for toxin tests and injected in to mice, they died with botulinal symptoms after 20 hours, except for the ones neutralised with antitoxin type C. The samples of feces, liver and ration were negative for toxins (Table 2). The material from the enrichment tubes with growth that was streaked in reinforced clostridial agar presented typical colonies of *C. botulinum* but showed no toxins when tested in mice.

Table 1 - Test for presence of botulinal toxins.

Symbols: * = Death with typical clinical signs of botulism; the dilution level of the test samples with antitoxin in the neutralisation test was 1:1 by volume; the untreated samples were similarly diluted using gelatin-phosphate buffer

Samples	Treatment	Effect on mouse
Serum of affected birds	Untreated Heated at 100°C/10 min + type C antitoxin + type D antitoxin	* None None *
	Extracts clarified	
Crop Content	Untreated Heated at 100°C/10 min + type C antitoxin + type D antitoxin	* None None *
Gizzard content	Untreated Heated at 100°C/10 min + type C antitoxin + type D antitoxin	* None None *
Intestine content	Untreated Heated at 100°C/10 min + type C antitoxin + type D antitoxin	* None None *
Feces	Untreated Heated at 100°C/10 min + type C antitoxin + type D antitoxin	* None None None
Liver	Untreated	None
Feed	Untreated	None

Table 2 - Test for botulinal toxins of samples submitted to growth enrichment medium.

Symbols: * = Death

Samples	Treatment	Effect on mouse
Crop content	Untreated Neutralised + Antitoxin type C	* None
Gizzard content	Untreated Neutralised + Antitoxin type C	* None
Intestine content	Untreated Neutralised + Antitoxin type C	* None
Feces	Untreated	None
Liver	Untreated	None
Ration	Untreated	None

Discussion

Botulism in broiler chickens has been reported by Roberts & col. (8) in England and by Saraiva (10) in Rio Grande do Sul, Brazil. Botulism is normally caused by the ingestion of preformed toxin. The general features of this outbreak were similar to those described by Roberts & Collings (9) when a large number of birds died of botulism, but when a source of preformed toxin was not found. In another outbreak, Blanford & Roberts (2) found that putrefying chicken flesh was the source of toxin, and that the organism could have been in the carcasses prior to death, or in the litter. In this outbreak the number of decomposing carcasses of broilers that died from no specific causes was approximately 1600, added to a number of other birds (such as wild pigeon) that remained on the litter for 4 to 5 days, in the month of March, when the temperature in the region is over 30°C. When the litter was removed, all carcasses eliminated and the water supply changed, the deaths stopped. If the carcasses had been removed promptly from the sheds, this outbreak would not have occurred.

Dipterous fly larvae feeding on rotting material infected with *C. botulinum*, though not affected themselves, carry toxin and kill animals feeding on them. This makes captive animals especially vulnerable to botulism. In this case, a number of maggots were found in the crops of the birds. The maggots on the carcasses of earlier victims of the disease may have contained toxin and further perpetuated the disease. It may be also that the stagnant water was contaminated by some chickens after pecking contaminated carcasses, turning the water into another source of contamination.

Our results suggest that the decomposition carcasses of the chickens were the contaminating material, because birds may carry this organism as part of the intestinal microflora and, when they die from any other problem, they give anaerobic conditions for the spores of *Clostridium botulinum* to grow and produce toxin. As these carcasses were not removed from the sheds, they were pecked by the other birds.

Acknowledgements

We should like to thank Prof. Frederick C. Strong III for his comments on the manuscript and for corrections of the translation.

References

1. Blandford, T.B.; Roberts, T.A.; Ashton, W.L.G. - Losses from botulism in Mallard Duck and other waterfowl. *Vet. Rec.*, 85:541-543, 1969.
2. Blandford, T.B. & Roberts, T.A. - An outbreak of botulism in broiler chickens. *Vet. Rec.*, 87:258-261, 1970.
3. Döbereiner, J. - Relatório técnico sobre a investigação da causa de mortandades de bovinos ocorrendo no sul de Goiás. Rio de Janeiro, Embrapa, 1979.
4. Flay, L.D.; Kaufman, O.W. & Ryel, L.A. - Mass mortality of water birds in Lake Michigan, 1963-1964. Michigan, Great Lakes Division Publ. nº 13, 1965.
5. Jeffman, I - Aspectos bacteriológicos relacionados com o anaeróbio responsável pelo surto de botulismo em Porto Alegre, 1958. *Revista Escola de Agronomia e Veterinária*, 3:37-47, 1960.
6. Jensen, W.E. & Allen, J.P. - A possible relationship between aquatic invertebrates and avian botulism. *Wildlife, Trans. N. Amer. Nat. Resources Conf.*, p.171-180, 1960.
7. Langenegger, J. - Relatório de viagem de estudo no Estado do Ceará para esclarecer causa de mortes de bovinos que ocorre anualmente no município de Granja (Ce). Rio de Janeiro, Embrapa, 1979.
8. Roberts, T.A.; Thomas, A.I. & Gilbert, R.J. - A third outbreak of type C. *botulinum* in broiler chickens. *Vet. Rec.*, 92:107-109, 1973.

9. Roberts, T.A. & Collings, D.F. - An outbreak of type *C. botulinum* in broiler chicken. *Avian Diseases*, 17:650-658, 1973.
10. Saraiva, D. - *Clostridium botulinum* tipo C isolado de galinhas de Santa Maria (RS). In: - *Anais do IX Congresso Brasileiro de Microbiologia*, Belo Horizonte MG, 23-27 de julho de 1978.
11. Smith, G.R. - Recent european outbreak of botulism in waterfowl. *I.W.R.B. Bulletin*, 39:40-72, 1975.
12. Smith, L.D.S. - Botulism, the organism, its toxins, the disease. USA, Spring Illinois, Charles C. Thomas, 1977.
13. Tokarnia, C.H.; Langenegger, J.; Langenegger C.H. & Carvalho, E.V. de - Botulismo em bovinos no Piauí, Brasil. *Pesq. Agropec. Bras.*, 5:465-472, 1970.
14. Ward, B.Q.; Garret, E.S. & Reese, G.B. - Further indication of *Clostridium botulinum* in Latin American waters. *Appl. Microbiol.*, 15:1509, 1967.

HAMMONDIA HAMMONDI NAS FEZES DE GATOS NA CIDADE DE SÃO PAULO, BRASIL

Saemi Ogassawara
Sérgio Benassi

Deptº de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP, Brasil

Ligia M. Ferreira Jamra

Laboratório de Toxoplasmose
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
05403 São Paulo SP, Brasil

Plínio Tadeu Zenker Leme

Deptº de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP

& Mitika Kuribayashi Hagiwara

Deptº de Clínica Médica
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP

Resumo

Pela primeira vez no Brasil, duas amostras de *H. hammondi* foram isoladas de fezes de gatos, a partir de exames coproparasitológicos realizados em gatos na cidade de São Paulo. Foram encontrados dois animais eliminando oocistos medindo 11,9x13,3 μ m. Após a esporulação continham dois esporocistos contendo cada qual quatro esporozoítas e um corpúsculo residual. Administração oral de oocistos esporulados produziram grandes cistos (12,5-68,8 x 43,8-178 μ m) sem septações, nos músculos esqueléticos e cistos subesféricos (poucos) nos cérebros de camundongos. A maioria deles não desenvolveu anticorpos anti-Toxoplasma pelo Teste do Corante, mas uns poucos apresentaram baixos níveis de anticorpos pelo mesmo Teste. Não foi possível transferir os cistos teciduais de camundongo para camundongo por via intraperitoneal. Oocistos não esporulados foram eliminados nas fezes de gatos 5-6 dias após a ingestão de carcaças e cérebros de camundongos. Entretanto, gatos oralmente infectados com oocistos esporulados não eliminaram oocistos nas fezes. Nos dois últimos grupos o Teste do Corante foi negativo.

Summary

Hammondia hammondi in the feces of cats in the city of São Paulo, Brazil

For the first time in Brazil two strains of *Hammondia hammondi* were isolated from cat feces. Parasitological

examinations carried out in cats of the city of São Paulo revealed that two animals shed oocysts of $11.9 \times 13.3\mu m$ in the feces. After sporulation the oocysts contained two sporocysts with four sporozoites each and a sporocysts residuum. Sporulated oocysts administered orally to mice produced large cyst ($12.5-68.8 \times 43.8-178\mu m$) without septa in skeletal muscles and a few subspherical cysts in the brains of these mice. Most of the mice did not develop antibody titers to toxoplasma when the Dye Test was used. Nevertheless, a few mice showed low antibody levels. It was not possible to transfer tissue cysts from mouse to mouse by the intraperitoneal route. Unsporulated oocysts were found in the feces of cats 5-6 days after the ingestion of carcasses and brains of mice. However cats given orally sporulated oocysts did not shed oocysts in their feces. In the latter two groups the Dye Test was negative.

Introdução

Hammondia hammondi, uma coccidia estruturalmente semelhante a *Toxoplasma gondii*, tem sido encontrada nas fezes de gatos naturalmente infectados, nos Estados Unidos, em Iowa (2), Ohio (1) e Havaí (7) e na Alemanha (6).

H. hammondi é um parasita obrigatoriamente heteroxeno, envolvendo, no seu ciclo evolutivo, um hospedeiro da fase assexuada - camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Rattus rattus*), sob condições naturais (4) e, além destes, cobaias e hamsters (sob condições experimentais) (2), e um outro da fase sexuada - gatos.

Face aos raros encontros de *H. hammondi*, como se pode apreciar pelas publicações existentes, objetivou-se relatar, pela primeira vez, em São Paulo e no Brasil, a presença desse parasita em gatos, sob condições naturais.

Material e Métodos

Animais utilizados - Foram utilizados 12 gatos, sem raça definida, de 6 meses a 2 anos de idade, comprovadamente livres de infecções parasitárias; camundongos albinos suíços, de 20 a 30g, em número de 4 a 6 por inoculação.

Origem das amostras - Em um prévio inquérito coproparasitológico em gatos, realizado na cidade de São Paulo (5), foi encontrado um animal (no total de 100 animais) - uma gata, Siamês, de 2 anos de idade, positivo para oocistos tipo *Toxoplasma-Hammondia* (HG-1, 1979). Numa segunda fase, um outro animal (num total de 40 animais) - uma gata, sem raça definida, 3 meses de idade, apresentou o mesmo tipo de oocistos em suas fezes (HG-2, 1981). Além da coccidia citada, o primeiro animal apresentava ovos de *Ancylostoma* sp. e o segundo, de *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp. e oocistos de *Isospora felis*.

Os oocistos tipo *Toxoplasma-Hammondia*, após a esporulação, foram oralmente administrados em camundongos. Ao redor de dois meses após a inoculação, esses animais foram sacrificados e suas carcaças e vísceras fornecidas a gatos. As fezes destes gatos foram diariamente examinadas para a pesquisa de oocistos. Não houve qualquer mortalidade de camundongos durante o período de observação.

Os oocistos, assim obtidos, foram esporulados e estudados, como segue:

Inoculação de camundongos - a) **Inoculação oral de oocistos** - Os oocistos eliminados nas fezes de gatos foram re-inoculados em camundongos, na dose aproximada de 10^3 a 10^5 . Esses camundongos foram sangrados e sacrificados um ou mais meses depois; b) **Inoculação intraperitoneal de suspensões musculares e de cérebros de camundongos contendo cistos** - As suspensões foram preparadas segundo Christie & col. (1) e administradas na dose de 1ml, por 2 dias consecutivos. Decorridos um mês ou mais, foram sangrados e sacrificados. Os soros de todos foram testados frente a antígeno de

Toxoplasma gondii, pela reação de Sabin & Feldman (RSF) ou Teste de Corante (3); c) Exame de cistos - Os cistos intramusculares e cerebrais foram examinados a fresco, conforme Christie & col. (1) e em cortes histológicos corados pela hematoxilina eosina. Foram feitas mensurações de cistos livres.

Inoculação de gatos - a) Administração oral de oocistos esporulados - Na dose aproximada de $1,5 \times 10^6$, uma vez ou por dois dias consecutivos; decorridos um mês, foram administrados aos mesmos animais, camundongos infectados e, sacrificados após um mês; b) Administração oral de carcaças e cérebros de camundongos infectados - Os gatos, assim infectados, foram, após um mês de observação, sacrificados.

Em ambos os casos, os gatos foram sangrados, antes e depois de cada administração, para pesquisa de anticorpos anti-*Toxoplasma*, pela RSF e, diariamente, procedeu-se ao exame de fezes para o encontro de oocistos. Para cada amostra isolada foram utilizados 6 gatos.

As técnicas utilizadas e outros detalhes relativos foram publicados anteriormente (5).

Resultados

Oocistos - Os oocistos não esporulados eram esféricos ou ovais, incolores, medindo $10,0\text{--}14,1 \times 11,0\text{--}17,3\mu\text{m}$ ($\bar{x}= 11,9 \times 13,3\mu\text{m}$). Após a esporulação que levou de 2-3 dias a $25\text{--}26^\circ\text{C}$, mediram $12,6\text{--}14,1 \times 10,4\text{--}12,6\mu\text{m}$ ($\bar{x}= 12,9 \times 11,6\mu\text{m}$); com dois esporocistos elipsóides, contendo cada qual quatro esporozoítas e um corpúsculo residual esporocístico.

Infecção em camundongos - a) Inoculação oral de oocistos - Resultou no desenvolvimento de cistos, nas musculaturas esqueléticas e cardíacas e no cérebro, com as amostras HG-1 e HG-2. Cistos nos músculos foram vistos a fresco, com aumento 100x e em cortes histológicos, corados pela hematoxilina eosina. Os cistos eram alongados e sem septações (Fig. 1).

Cistos subesféricos foram vistos a fresco, em preparações diretas de um fragmento do cérebro ou nas suspensões cerebrais, embora em pequeno número. Os cistos não foram encontrados em cortes histológicos (Fig. 2).

Os cistos extraídos das musculaturas de camundongos sacrificados, um mês após a inoculação de oocistos, mediram $43,8\text{--}118,8 \times 12,5\text{--}56,2\mu\text{m}$ ($\bar{x}= 66,9 \times 38,1\mu\text{m}$). Foram medidos 50 cistos. Em camundongos sacrificados seis meses após a inoculação, os cistos intramusculares mediram $81,2\text{--}17,8 \times 37,5\text{--}68,8\mu\text{m}$ ($\bar{x}= 128\text{--}53\mu\text{m}$), num total de 37 cistos; os cistos cerebrais, $20,6\text{--}68,8 \times 18,8\text{--}50\mu\text{m}$ ($\bar{x}= 39,1 \times 36,8\mu\text{m}$), correspondentes a mensurações de 20 cistos livres.

Figura 1 - Cisto de *H. hammondi* extraído de musculatura esquelética de camundongo. Aumento original 400x

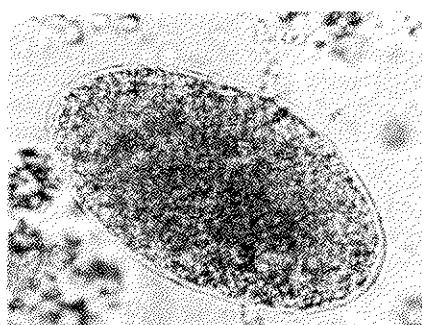
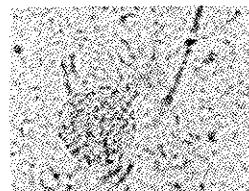


Figura 2 - Cisto de *H. hammondi* no cérebro de camundongo. Aumento original 400x



Não se verificou morte, nem qualquer sintomatologia nos camundongos inoculados durante todo o período de observação. A maioria dos camundongos infectados com oocistos esporulados não desenvolveu anticorpos anti-*Toxoplasma* pela RSF, no entanto, alguns inoculados com 5×10^5 oocistos desenvolveram baixos títulos ($\geq 1:16$); b) *Inoculação intraperitoneal de suspensões musculares e cerebrais de camundongos* - Não foram encontrados cistos nos músculos, nem nos cérebros e os soros não apresentaram anticorpos anti-*Toxoplasma*.

Infecção em gatos - a) *Inoculação oral de oocistos* - Os exames de fezes foram negativos, durante os 30 dias de observação e seus soros também negativos pela RSF. Estes mesmos gatos, após a administração de carcaças e cérebros de camundongos infectados, eliminaram oocistos 5-6 dias depois e continuaram por 1 a 2 semanas. Sacrifícios um mês depois, seus soros ainda eram negativos pelo mesmo teste; b) *Inoculação oral de carcaças e cérebros de camundongos infectados* - A eliminação de oocistos não esporulados iniciou-se 5-6 dias após a infecção e persistiu por 1-2 semanas, mas o exame sorológico foi negativo, em todos os animais, pela RSF.

Discussão

Oocistos, semelhantes aos de *Toxoplasma*, foram isolados das fezes de duas gatas, sob condições naturais. A administração oral de oocistos esporulados produziu cistos no músculo esquelético e cérebro de camundongos. No entanto, a maioria não desenvolveu anticorpos anti-*Toxoplasma*, contudo, alguns chegaram a apresentar baixos títulos ($\geq 1:16$). Não foi possível produzir infecção de camundongo a camundongo, com cistos e os soros destes animais foram negativos pela RSF. Estes resultados são concordantes com os relatados por outros autores (1, 2, 6) como característicos de infecção por *Hammondia*, em camundongo.

Infecção toxoplasmica, com formação de anticorpos, pode ser obtida com a inoculação de oocistos. A infecção toxoplasmica, em camundongos, pode ser mantida indefinidamente, pela inoculação de taquizoítas ou de bradizoítas, o que o distingue de *Hammondia* (1).

A infecção não se estabeleceu em gatos, infectados, oralmente, com oocistos esporulados de ambas as amostras (HG-1 e HG-2), pois não houve eliminação de oocistos e seus soros permaneceram negativos pela RSF. Entretanto, a suscetibilidade desses animais pode ser comprovada, pela administração oral de carcaças e cérebros de camundongos, contendo cistos, porquanto eliminaram oocistos nas fezes sem, no entanto, haver alteração no título do soro. Este comportamento foi também observado no grupo de animais, alimentados apenas com carcaças e cérebros de camundongos infectados. Em contraposição, há eliminação de oocistos nas fezes e formação de anticorpos anti-*Toxoplasma* em gatos, alimentados com cistos de *Toxoplasma* (1).

Em vista das características mencionadas, concluímos que as amostras HG-1 e HG-2, tratam-se de *Hammondia hammondi* isoladas pela primeira vez em São Paulo e pelo que pudemos apurar, pela primeira vez no Brasil. Cabe aqui salientar que a distinção entre *Hammondia* e *Toxoplasma* é de importância epidemiológica, uma vez que estes dois agentes são estruturalmente semelhantes e porque camundongos infectados com *Hammondia* desenvolvem anticorpos que podem reagir com antígeno do *T. gondii* (8).

Referências Bibliográficas

- Christie, E.; Dubey, J.P. & Pappas, P.W. - Prevalence of *Hammondia hammondi* in the feces of cats in Ohio. *J. Parasitol.*, 63:929-931, 1977.
- Frenkel, J.K. & Dubey, J.P. - *Hammondia hammondi* gen. nov., sp. nov., from domestic cats, a new coccidian related of *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. *Z. Parasitenk.*, 46:3-12, 1975.
- Jarra, L.M.F. & Guimarães, E.C. - Simplificações em técnicas para o estudo de toxoplasmose. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 9:67-70, 1976.
- Mason, R.W. - The detection of *Hammondia hammondi* in Australian and the identification of a free-living intermediate host. *Z. Parasitenk.*, 57:101-106, 1978.

5. Ogassawara, S.; Benassi, S.; Hagiwara, M.K. & Larsson, C.E. - *Isospora* spp.: estudo sobre a ocorrência na espécie felina, na cidade de São Paulo. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11:126-130, 1980.
6. Rommel, M. & Seyerl, F. - The first isolation of *Hammondia hammondi* from the feces of cats in Germany. Berl. Münch. Tierärzt. Wochens., 89:398-399, 1976.
7. Wallace, G.D. - Observations on a feline coccidium with some characteristics of *Toxoplasma* and *Sarcocystis*. Z. Parasitenk., 46:167-178, 1975.
8. Weiland, G.; Rommel, M. & Seyerl, F. - Serological cross reactions between *Toxoplasma gondii* and *Hammondia hammondi*. Berl. Münch. Tierärzt. Wschr., 92:30-32, 1979.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS. II -PREVALÊNCIA EM PORTADORES SÃOS E PACIENTES COM CONJUNTIVITE ESTAFLIOCÓCICA

Maria Aparecida de Araújo
 Ana Maria Uthida-Tanaka
 & Olga Coelho Castro

Disciplinas de Microbiologia e Dermatologia
 Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
 Campus de Ribeirão Preto
 14100 Ribeirão Preto SP, Brasil

Resumo

Quarenta e cinco amostras de *Staphylococcus aureus*, isoladas de doentes com conjuntivite estafilocócica e de portadores sãos, foram estudadas sob os seguintes aspectos: susceptibilidade a antimicrobianos e a fagos e produção de coagulase. Vinte das amostras foram do modelo de antibiograma RSSS de Barber e Burston e 16 do modelo RSSR. Não houve correlação entre fagótipo e tempo para coagulação do plasma. Foi observada maior frequência de amostras com fagótipos do grupo III, sendo que nenhuma das amostras isoladas de secreção ocular foi fagotipável.

Summary

Staphylococcus aureus. II - Occurrence in healthy carriers and patients with staphylococcal conjunctivitis

Forty five strains of *Staphylococcus aureus* were isolated from healthy carriers and patients with staphylococcal conjunctivitis. Susceptibility to antimicrobial agents and phages and production of coagulase were studied. Twenty of the isolates were from the Barber and Burston RSSS antimicrobial susceptibility pattern and 16 of the RSSR pattern. There was no correlation between phage types and time for plasma coagulation to occur. Phage types of group III accounted for the majority of staphylococcal isolates and none of the strains isolated from eye cultures was phage typable.

Introdução

Devido a elevada prevalência de *Staphylococcus aureus* na maioria de portadores extra-hospitalares, é possível que estes desempenhem um papel importante na etiologia das infecções estafilocócicas em comunidades fechadas, tais como, consultórios, fábricas, restaurantes e repartições públicas (1, 5, 9). A presença de lisozima na secreção conjuntival é um fator desfavorável à colonização de *S. aureus* nesta área. Contudo, é conhecida a participação deste microrganismo na conjuntivite purulenta. Um surto dessa manifestação, diagnosticado entre funcionários que trabalham numa seção municipal de processamento de dados em Ribeirão Preto, SP, resultou na presente investigação, na qual foi pesquisada a ocorrência de *S. aureus* neste grupo de indivíduos, formado tanto pelos pacientes com conjuntivite, como pelos portadores sãos; foram estudadas algumas características das amostras isoladas.

Tabela 1 - Ocorrência de estafilococos nas áreas anatômicas

Área examinada	Nº de indivíduos com estafilococos no grupo		Total
	Doentes	Portadores	
Garganta	2	4	6
Mão	8	7	15
Narina	8	8	16
Olho	8	8	16
Total	26	19	45

Tabela 2 - Ocorrência de estafilococos em mais de uma área anatômica.

Símbolos: * G = Garganta; M = Mão; N = Narina; O = Olho

Áreas*	Nº de amostras isoladas no grupo		Total
	Doentes	Portadores	
N e G		1	1
N e M		4	4
N, M e G		3	3
N, M e O	6		6
N, M, G e O	2		2

Material e Métodos

Material clínico - Os espécimes de 16 servidores municipais de Ribeirão Preto SP, foram colhidos em único dia, no ano de 1981, utilizando-se zaragatoas. Entre os indivíduos examinados, distinguiram-se 2 grupos: o designado por "Doentes", aqueles que se referiram a ardor ou prurido, vermelhidão, lacrimejamento e/ou secreção conjuntival purulenta e o designado como "Portadores", correspondendo aos indivíduos sem queixas e sem manifestações oculares. As áreas anatômicas amostradas foram: garganta, mão, narina e olho.

Isolamento das amostras de estafilococos - Os espécimes foram imediatamente inoculados em placas com meio de ágar sangue e em meio para o teste da utilização do manitol, sendo incubados a 37°C por 24 horas. Colônias típicas de *S. aureus*, foram submetidas à prova da coagulase em tubos, cuja leitura foi efetuada a intervalos de 0,5, 1, 1,5, 2, 3 e 6 horas (4).

Susceptibilidade a antimicrobianos - A susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos foi determinada utilizando-se a técnica de Bauer & col. (3). As amostras foram classificadas segundo os modelos de Barber & Burston (2).

Classificação das amostras através da fagotipagem - A fagotipagem obedeceu à técnica de Blair & Williams (5). Foram utilizados os seguintes fagos: Grupo I - 29, 52, 52A, 79, 80; Grupo II - 3A, 3C, 55, 71; Grupo III - 6, 42A, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85; Não classificados - 81, 94, 95, 96; Fagos experimentais - 86, 88, 89, 90, 92, D11, HK2; e Fagos extra - 42D, 187.

Resultados

Presença de estafilococos nas pessoas estudadas - A prevalência de *S. aureus*, no grupo de 16 servidores municipais examinados, foi de 100%. Em relação à positividade, nas áreas anatômicas amostradas, verificou-se que, no grupo de doentes, todos os oito indivíduos apresentaram o microrganismo no material colhido de olho e mão; no grupo de portadores, em nenhuma das culturas o estafilococo esteve presente no olho (Tabela 1). Na narina a prevalência foi de 100%, em ambos os grupos. Na garganta, a positividade foi menor, isolando-se o microrganismo somente em seis dos indivíduos estudados.

Quanto à associação de áreas positivas para estafilococos, verificou-se que os 16 indivíduos estavam colonizados em mais de uma área do corpo, sendo que, no grupo "Doentes", a positividade foi de até quatro áreas e no grupo "Portadores" foi de duas em cinco das pessoas examinadas (Tabela 2).

Modelos de antibiograma - Das 45 amostras, 20 (44,4%) foram do modelo RSSS de Barber e Burston, das quais 13 isoladas de portadores (Tabela 3). Em seguida, o modelo mais frequente foi RSSR, com 16 amostras, das quais 13 isoladas de doentes. Em quatro dos oito doentes foram isoladas amostras de estafilococos do olho e outras áreas do corpo com o modelo RSSR (Tabela 4). O modelo RSSS, que foi isolado das mãos

de quatro portadores, também esteve presente na narina de três desses indivíduos e na garganta do quarto (Tabela 4).

Tabela 3 - Susceptibilidade a antimicrobianos de 47 amostras de *S. aureus*

Modelo de antibiograma	Nº de amostras no grupo						Total
	Doentes			Portadores			
	N	G	O	M	N	G	M
SSSS					1		1
RSSS	2	2	3	5	3	5	20
RSSS	2	1	1				4
RSSR	3	1	6	3	2		16
RSRS						1	1
RCSR	1			1			2
RRRR				1			1
Total	8	2	8	8	8	4	45

Tabela 6 - Fagotipos, modelos de antibiograma e tempo para reação da coagulase das amostras isoladas de portadores saõos

Fagotipo	Modelo de antibiograma	Tempo para reação da coagulase (horas)		
		0,5	1,5	2,0
29	RSSS	N ₁₀ , N ₁₆ , M ₁₀		
	RSSR	N ₁₆	M ₁₄	
3A/3C/55/71	RSSS	N ₁₁		
81	RSSS		G ₉	
85	SSSS	G ₁₂		
95	RSSS		N ₉	
N ₂	RSSS	N ₁₁ , M ₁₂ N ₁₄ , G ₁₄ G ₁₅ , M ₁₆		
	RSSR	N ₁₂	N ₁₅ , M ₁₅	
	RRSR		N ₁₃	
	RSRS	M ₁₃		

Tabela 4 - Ocorrência de estafilococos com os mesmos modelos de antibiograma em mais de uma área do corpo

Modelo de antibiograma	Estafilococos nas áreas do corpo					
	Doentes	Portadores				
	O,N	O,G	O,M	O,N,M	M,N	M,G
RSSS				1		3
RSSR	1	1	1	1		

Tabela 5 - Fagotipos, modelos de antibiograma e tempos para reação da coagulase das amostras isoladas de doentes

Fagotipo	Modelo de antibiograma	Tempo para reação da coagulase (horas)		
		0,5	1,5	2,0
29	RSSR			M ₆
81	RSSS		N ₁	
47/53/77/83A/84/85	RSSS			N ₂
	RSSR		G ₁	
	RSSS		M ₁	M ₇
	RSSS		M ₅	M ₄
	RSSS		N ₄	
	RSSR		N ₈	
	HK2			M ₈
	42E			G ₃
	RRRR			M ₃
	NT			
	RSSS		N ₃	O ₅
	RSSR	O ₁ , O ₄ , M ₂		O ₇
	RSSR	N ₇		O ₂ , O ₃ , O ₆ O ₈ , N ₅ , N ₆

Fagotipagem - Através da fagotipagem foi possível reconhecer 12 padrões líticos, que identificaram 13 amostras, das 26 amostras de doentes e oito das 19, isoladas dos portadores. Entre as 24 amostras que não foram fagotipáveis, 13 foram isoladas de doentes e 11 de portadores (Tabelas 5 e 6). Os fagos do grupo III lisaram nove de doentes e 11 de portadores (Tabelas 5 e 6). Os fagos do grupo "Doentes" e o fago 29, do grupo I, lisaram 13 amostras tipáveis, isoladas do grupo "Doentes" e o fago 29, do grupo I, lisou quatro das oito amostras, tipáveis do grupo "Portadores".

Para a análise dos resultados, designaremos os indivíduos doentes com números de um a oito e os portadores com os números de nove a 16. Quando nos referimos à amostra N₁, significa que foi isolada da narina do doente nº 1 e assim por diante. No indivíduo nº 4, houve concordância no fagótipo das amostras isoladas da narina e da mão, porém, a amostra do olho não foi tipável, assim como também não o foi nenhuma das amostras dessa área, nos outros sete doentes (Tabela 5). No indivíduo nº 6 apenas a amostra da mão foi fagotipável (tipo 29), embora o modelo de antibiograma RSSR tivesse sido idêntico para essa amostra e para as isoladas de narina e olho, as quais não foram tipáveis.

O indivíduo nº 10 apresentava o mesmo fagótipo (tipo 29) e o mesmo modelo de antibiograma (RSSS), nas amostras isoladas da narina e mão (Tabela 6).

Coagulase - No teste de plasmocoagulase, verificou-se que amostras com o mesmo fagótipo levaram à formação de coágulo em tempo de até 2 horas (Tabela 5).

Amostras isoladas de secreção conjuntival - Das oito amostras isoladas de olho, seis foram positivas no teste da enzima em tempos de 0,5 (duas amostras) e duas horas (quatro amostras), embora apresentassem o mesmo modelo de antibiograma (RSSR) (Tabela 5). As outras duas amostras com o modelo RSSS coagularam o plasma em uma, cinco e duas horas.

Discussão

O presente trabalho constitui uma demonstração adicional de que o estudo de outras características, além do fagótipo, permite demonstrar semelhanças entre amostras de *S. aureus*, mesmo quando isoladas de áreas ou de indivíduos diferentes.

A semelhança entre as amostras de secreção conjuntival, dos pacientes nº 2, 3, 6 e 8, pode ser observada através do mesmo modelo de antibiograma (RSSR) e do tempo de reação de plasmocoagulase (duas horas), sendo que de apenas um deles (indivíduo nº 6) foi isolada, da narina, uma amostra com estas mesmas características. Admitindo-se que seja a narina a fonte de contaminação, é provável que o indivíduo nº 6 seja o responsável pela disseminação das amostras não susceptíveis aos fagos testados, com modelo de antibiograma RSSR e com tempo de coagulação do plasma de duas horas, nos quatro doentes acima mencionados.

Apesar da amostra N5 ter as mesmas características que a amostra N6, parece pouco provável que seja ela responsável por este surto de conjuntivite, visto que a amostra 05 não foi lisada pelos fagos, apresentava-se com modelo RSSS e necessitou de apenas 1,5 hora para coagular o plasma. Em nenhum dos doentes, as amostras isoladas das mãos foram semelhantes às da secreção conjuntival, sendo que no indivíduo nº 2, a diferença entre as duas amostras foi apenas em relação ao tempo de positividade na reação de coagulase (0,5 e 2 horas). Assim, a mão não se revelou, no momento da amostragem, ter sido a via de disseminação.

Parece evidente que estudos adicionais são necessários para verificar se as amostras de olho dos indivíduos nº 2, 3, 6 e 8 e da narina do indivíduo nº 6 não podem ser classificadas através da determinação de outras características, como a sorotipagem.

Assim, fica ressaltado o importante papel da narina na disseminação do estafilococos (9); embora, apesar deste estudo não ter demonstrado que a mão tenha sido o veículo de contaminação, devemos estar atentos também para esta possibilidade.

Referências Bibliográficas

1. Araújo-Arantes, M.A.; Uthida-Tanaka, A.M. & Castro, O.C. - *Staphylococcus aureus*. I - Prevalência de portadores extra hospitalares (restaurante) na cidade de Ribeirão Preto SP, 1981. Rev. Medicina HCFMRP-USP e CARL, 15:225-232, 1982.
2. Barber, M. & Burston, J. - Antibiotic-resistant staphylococcal infection: a study of sensitivity in relation to bacteriophage types. Lancet, 2:578-583, 1955.
3. 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.
4. Bayliss, B.G. & Hall, E.R. - Plasma coagulation by organisms other than *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol., 89:101-105, 1965.
5. Blair, J.E. & Williams, R.E.O. - Phage typing of staphylococci. Bull. WHO, 24:771-784, 1961.
6. Parker, M.T.; Asheshov, E.V.; Hewitt, J.H.; Nakhla, L.S. & Brock, B.M. - Endemic staphylococcal infections in hospitals. Ann. N.Y. Acad. Sci., 236:466-484, 1974.
7. Santos, B.M.O. & Solé-Vernin, C. - Papel epidemiológico dos portadores saõs de *Staphylococcus aureus* como fonte de infecção. Rev. Inst. Med. trop. (S. Paulo), 23:217-224, 1981.

8. Solé-Vernin, C. & Uthida-Tanaka, A.M. - A prova de Moore conjugada ao antibiograma na identificação das amostras hospitalares e não hospitalares de *Staphylococcus aureus*. Hospital (Rio de Janeiro), 75:2043-2086, 1969.
9. Uthida-Tanaka, A.M. - Carriage of *Staphylococcus aureus* in the nose and the skin of patients without pyogenic dermatoses. Dermatologica, 146:65-85, 1973.

As características marcantes, diferenciais, entre *Vibrio lactose-positivo*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*, estão inseridas na Tabela 2.

A finalidade da presente nota é descrever o *Vibrio lactose-positivo* e diferenciá-lo de *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio alginolyticus*. O primeiro, é conhecido patógeno para o homem, causador de gastroenterites após a ingestão de alimentos marinhos contaminados, podendo ser, mais raramente também, agente de infecções tissulares; o último, é agente de otites, conjuntivites e infecções superficiais, devido à exposição à água do mar.

Vibrio lactose-positivo é microrganismo clinicamente importante, sendo essencial identificá-lo.

I SOLAMENTO E CARACTERÍSTICAS DE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÉNICA ISOLADAS DE ALIMENTOS

Bernadete D.G.M. Franco

Deptº de Alimentos e Nutrição Experimental
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Caixa Postal 30786
01051 São Paulo SP, Brasil

Beatriz Ernestina C. Guth
& Luiz R. Trabulsi

Deptº de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia
Escola Paulista de Medicina
Caixa Postal 20342
01000 São Paulo SP, Brasil

Resumo

A patogenicidade de 1351 cepas de *Escherichia coli* isoladas de 287 amostras de alimentos diversos foi estudada, através da sorotipagem para pesquisa de EPEC (*E. coli* enteropatogênica clássica) e de EIEC (*E. coli* invasora). A capacidade de produção das enterotoxinas LT e ST foi também pesquisada. Observou-se que 5,2% dos alimentos contaminados com *E. coli* tinham cepas enteropatogênicas, com predominância de ETEC. Entre as EPEC, foram detectados os soroagrupos O26 e O125. Não foi observada nenhuma cepa invasora. Entre as cepas de ETEC, predominaram aquelas produtoras apenas da toxina LT pertencentes a vários sorotipos. Nenhuma cepa enterotoxigênica apresentou os fatores de colonização CFA/I e CFA/II. Entre as cepas enteropatogênicas isoladas, observaram-se algumas resistentes a um ou mais antibióticos, sendo a maioria sensível aos antibióticos estudados.

Summary

Isolation and characteristic of enteropathogenic Escherichia coli strains isolated from foods

The pathogenicity of 1351 strains of *Escherichia coli*, isolated from 287 food samples, was studied through serotyping for EPEC (enteropathogenic *E. coli*) and EIEC (invasive *E. coli*). The ability to produce enterotoxins ST and LT was also investigated. It was observed that 5,2% of food samples contaminated with *E. coli* harboured enteropathogenic strains, with predominance of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). The EPEC strains belonged to serogroups O26 and O125 and no invasive strain was isolated. Among ETEC strains, there was a prevalence of enterotoxin LT producing ones, and several serotypes were involved. The presence of colonization factors CFA/I and CFA/II was not detected among ETEC strains. The EPEC and ETEC strains isolated showed resistance to one or more antibiotics, but the majority was sensitive to them.

Introdução

As condições higiênico-sanitárias da produção de alimentos, em nosso meio, são geralmente precárias e, portanto, é comum observar a presença de coliformes, inclusive *Escherichia coli*. Além da gravidade da constatação de que o alimento está contaminado com microrganismos de origem fecal, a presença de *E. coli* pode ter um significado particularmente importante, uma vez que existem linhagens que são enteropatogênicas para o homem e animais (37).

Nas últimas décadas, foram descritos vários surtos de gastrite, provocados pela ingestão de água e/ou alimentos, contendo algumas das linhagens patogênicas de *E. coli*. Cepas de *E. coli* enteroinvadora (EIEC), pertencentes ao sorogrupo 0124, foram responsáveis por surtos de diarréia, em grande número de indivíduos, inclusive crianças, em decorrência do consumo de água contaminada (16) e de queijo camembert francês (21). Surtos, causados por cepas de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), pertencentes ao sorogrupo 0111, envolvendo leite e água, foram relatados, respectivamente, na Argentina (20) e nos Estados Unidos (32). Em relação a *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), vários trabalhos têm demonstrado o envolvimento destas cepas com surtos de gastrite, provocados tanto pela ingestão de água, como de alimentos contaminados (19, 29, 33, 38). Além disso, ETEC tem sido envolvida como o principal agente etiológico da chamada "diarréia do viajante", síndrome que afeta indivíduos que se locomovem de países desenvolvidos para outros com saneamento básico deficiente (12, 17, 23).

Paradoxalmente, pouco se sabe a respeito da frequência com que estes patógenos podem ser encontrados nos alimentos e, portanto, se desconhece qual o seu papel na disseminação destas bactérias. O presente trabalho teve como objetivos investigar a frequência de cepas de *E. coli* enteropatogênica em uma grande variedade de alimentos, normalmente consumidos em nosso meio.

Material e Métodos

Amostras de alimentos e de E. coli - Parte das amostras de alimentos foi adquirida no comércio local, da cidade de São Paulo; parte correspondeu a amostras de alimentos rotineiramente analisados pela Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz. Em ambos os casos, somente foram consideradas as amostras de alimentos que continham *E. coli*. O isolamento de *E. coli* seguiu a metodologia proposta por Sack & col. (31), excetuando-se as amostras do Instituto Adolfo Lutz, que foram analisadas pelas técnicas de rotina para pesquisa de coliformes fecais em alimentos (10). A identificação bioquímica das cepas de *E. coli* foi feita segundo recomendações de Edwards & Ewing (6), com a simplificação introduzida por Toledo & col. (35, 36). Foram isoladas 1351 cepas de *E. coli*, provenientes de 287 amostras diferentes de alimentos: carne bovina, carne suína, frango, pescado, leite pasteurizado (tipo B e "especial"), queijo, farinha vegetal, hortaliças, condimentos, sucos naturais de frutas, alimentos mistos (com componentes de origem animal e vegetal) e refeições prontas. As amostras de carne compreenderam amostras cruas (frescas e congeladas), bem como amostras processadas industrialmente.

Sorotipagem para pesquisa de EIEC e EPEC - As cepas de *E. coli* imóveis e negativas no teste de produção de L-lisina descarboxilase, e todas as outras cepas de *E. coli* isoladas foram sorotipadas para pesquisa, respectivamente, daquelas pertencentes aos sorogrupo de *E. coli* invadoras e de *E. coli* enteropatogênicas clássicas.

A metodologia empregada foi a de aglutinação em lâmina (6), utilizando-se anticorpos contra os sorogrupo clássicos (026, 055, 086, 0111, 0119, 0125, 0127 e 0128) e invadoras (028ac, 029, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164 e 0167), da Probac do Brasil, Produtos Bacteriológicos Ltda.

Testes para detecção das enterotoxinas ST e LT - Para detecção da produção da toxina ST foi utilizado o teste do camundongo recém-nascido, proposto por Dean & col. (3). Para a detecção da toxina LT, empregou-se a linhagem celular Y-1, segundo técnica descrita por Donta & col. (4), posteriormente aperfeiçoada por Sack & Sack (30).

Pesquisa dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II - A presença de CFA/I e CFA/II foi pesquisada nas cepas de *E. coli* enterotoxigênica isoladas, empregando-se o teste de aglutinação em lâmina de hemácias humanas e bovinas (7, 8). Os resultados positivos foram confirmados por testes de aglutinação com antisoros específicos.

Sorotipagem das cepas de ETEC - A determinação dos抗原os O e H das cepas enterotoxigênicas isoladas foi realizada pelo Dr. Bernard Rowe, Central Public Health Laboratory, Londres.

Teste de sensibilidade a drogas - As cepas enteropatogênicas isoladas foram testadas quanto à resistência a drogas. Seguiu-se o método de Bauer & col. (1), empregando-se os seguintes discos de antibiograma (Cefar Fármaco Diagnóstica Ltda.) - amicacina (30mcg), ampicilina (10mcg), carbenicilina (100mcg), cefalotina (30mcg), cloranfenicol (30mcg), estreptomicina (10mcg), gentamicina (10mcg), kanamicina (30mcg), nitrofurantoína (300mcg), polimixina B (300 unid), sulfatrim (25mcg), sulfonamida (300mcg), tetraciclina (30mcg) e tobramicina (10mcg).

Resultados

De 1351 cepas de *E. coli* estudadas, foram isoladas 22 cepas (1,6%) de *E. coli* enteropatogênica, das quais 5 (0,4%) pertenciam ao grupo das EPEC e 17 (1,2%) pertenciam ao grupo das ETEC. Não foi isolada nenhuma cepa de *E. coli* invasora (ETEC). Estas cepas de *E. coli* enteropatogênica foram isoladas de 15 amostras de alimentos diferentes, indicando que 5,2% dos alimentos contaminados com *E. coli* tinha, pelo menos, uma das linhagens patogênicas deste microrganismo (Tabela 1).

As cinco cepas do EPEC pertenciam aos sorogrupo 026 e 0125 e foram isoladas de cinco alimentos diferentes (Tabela 2). Em relação à sensibilidade a drogas, uma cepa, isolada de frango, apresentou resistência múltipla a sete drogas e outra, isolada de leite pasteurizado do tipo B, mostrou-se resistente à tetraciclina e estreptomicina; as demais cepas foram sensíveis a todas as drogas testadas (Tabela 2).

Das 17 cepas de ETEC isoladas, 13 produziam apenas a enterotoxina LT ($LT^+ ST^-$) e as demais eram produtoras apenas de ST ($LT^- ST^+$). Não foi isolada nenhuma cepa produtora simultaneamente de LT e ST. As cepas de ETEC foram isoladas de 10 alimentos diferentes, pertenciam a diversos sorotipos e a grande maioria mostrou-se sensível às 14 drogas testadas (Tabela 3). Não se observou a presença dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II em nenhuma das cepas enterotoxigênicas isoladas.

Discussão

E. coli enteropatogênica foi encontrada em cerca de 5% das amostras de alimentos que continham *E. coli* em sua flora microbiana natural. Se forem considerados também

Tabela 1 - Incidência de *E. coli* enteropatogênica clássica (EPEC), *E. coli* enteropatogênica (ETEC) e *E. coli* invasora (ETEC) em 287 amostras de alimentos examinados.

	Amostras de alimentos contaminados com	Nº	%
EPEC	5	1,7	
ETEC	10	3,5	
ETEC	0	-	
Total	15	5,2	

Tabela 2 - Características das cepas de *E. coli* enteropatogênica clássica isoladas das amostras de alimentos examinados.

Símbolos: (a) A = Ampicilina; CR = Carbenicilina; ET = Estreptomicina; NT = Nitrofurantoína; ST = Sulfatrim; SF = Sulfonamida; TT = Tetraciclina

Cepa nº	Alimento de origem	Sorogrupo	Resistência à drogas (a)
1	Salsicha "a"	0125	Sensível
2	Salsicha "b"	0125	Sensível
3	Frango "a"	0125	AP, CR, ET, NT, ST, SF, TT
4	Frango "b"	0125	Sensível
5	Leite pasteurizado	026	ER, TT

os alimentos, nos quais não foi detectada contaminação com *E. coli*, tal frequência, provavelmente, se reduza à metade, já que, em um cálculo aproximado, 50% dos alimentos não apresentavam contaminação fecal. Estudos desenvolvidos nos EUA e em outros países mostraram que a frequência destes patógenos, nos alimentos, pode ser bastante variável. Hall & col. (14) e Frank & Marth (11) observaram frequência insignificante de EPEC, ao contrário de Fantasia & col. (9), que detectaram EPEC em, pelo menos, 10% das amostras de queijo analisadas. Relativamente a ETEC, estudos desenvolvidos nos EUA (31) e no Brasil (28), mostraram que a incidência era da ordem de 5 a 10% dos alimentos de origem animal.

Por outro lado, frequência praticamente nula de ETEC em um grande número de alimentos foi observada nas Filipinas (5) e no Ceilão (15).

Muitos são os fatores que interferem na quantificação de *E. coli* enteropatogênica em alimentos, sendo, provavelmente, estes fatores os responsáveis pelas discrepâncias observadas entre os resultados dos diferentes pesquisadores. O fator mais significativo pode ser a inadequação dos métodos empregados para isolamento e identificação de *E. coli* enteropatogênica em alimentos (22). Esta deve ter sido a razão principal da impossibilidade de se detectar ETEC nos alimentos estudados, uma vez que estas cepas são, com frequência, não fermentadoras de lactose, ou fermentadoras tardias deste açúcar, sendo portanto, eliminadas durante as análises rotineiras para isolamento de *E. coli*, sempre baseadas na capacidade de fermentação de lactose.

As cepas de EPEC isoladas pertenceram a apenas dois sorogrupo: 026 e 0125. Estes sorogrupo são esporadicamente associados às gastrenterites infantis, sendo mais frequentemente envolvidos os sorogrupo 0111 e 0119 (34), não detectados no presente estudo. Neste aspecto, evidencia-se que os alimentos devem contribuir apenas com uma pequena parcela na transmissão destes patógenos, acreditando-se que a via de contaminação mais importante seja o contato direto entre indivíduos infectados (37).

A frequência de ETEC, nos alimentos, foi da ordem de 3,5%. Considerados somente os alimentos de origem animal, esta frequência é de cerca de 5%, resultado bastante semelhante ao encontrado por outros pesquisadores (28, 31). As cepas de ETEC representaram a grande maioria (77%) de enteropatogênicas detectadas nos alimentos. A maioria (76%) produziu somente a toxina LT. Não foram observadas cepas capazes de produzir, simultaneamente, as toxinas LT e ST. Este fato já havia sido observado anteriormente (31), verificando-se que 58% das ETEC isoladas de alimentos de origem animal produziam somente a toxina LT. Em nosso meio, resultados semelhantes foram obtidos (28), também relativos a alimentos de origem animal. Em estudos realizados em São Paulo, sobre a frequência de isolamento de ETEC em crianças com gastrenterite, verificou-se que cepas de *E. coli* produtoras de LT e ST ou apenas de ST foram isoladas somente de casos de diarréia, enquanto que amostras produtoras apenas de LT foram mais frequentes em crianças controle (13, 26). Portanto, permanece ainda pouco esclarecido o papel das cepas enterotoxigênicas, produtoras apenas de LT na etiologia da diarréia endêmica em nosso país. No entanto, muitos dos surtos de gastrenterite, provocados pelo consumo de água ou alimentos foram causados por cepas que produziam somente a toxina LT (2, 19, 38). Consequentemente, a predominância deste tipo de ETEC nos alimentos não pode ser desprezada, apesar de surtos desta espécie não terem sido ainda relatados no Brasil.

Os sorotipos das cepas enterotoxigênicas, isoladas dos alimentos, não correspondem àqueles mais frequentemente, associados à diarréia endêmica em nosso meio (13, 27), bem como em outros países (24, 25). Isto se deve, provavelmente, ao fato da maioria das cepas serem produtoras somente de toxina LT, sabidamente pertencentes a uma grande variedade de sorotipos (13, 24, 27). Além disso, grande parte das cepas não puderam ser sorotipadas. Entre as cepas produtoras de toxina ST, detectou-se algumas do sorotipo 0149, já encontradas anteriormente em alimentos, porém associadas a antígeno H diferentes (28, 31).

O fato da maioria das cepas de ETEC ser produtora somente da toxina LT explica a ausência dos fatores de colonização CFA/I e CFA/II. Este fenômeno foi também verificado em cepas isoladas de fezes e de alimentos (18, 26). Esta propriedade, porém, pode não ser fundamental para a patogenicidade de ETEC, uma vez que outros fatores, ainda não descritos, podem estar presentes.

Até o momento não existe, em nosso país, nenhum estudo sobre a etiologia da

réia do viajante", não se sabendo se o Brasil apresenta semelhanças com outros países latinoamericanos, como o México, nos quais esta síndrome é causada primordialmente por ETEC (23). Caso assim seja, a importância dos alimentos, como via de disseminação destes patógenos, poderá acentuar-se, uma vez que a frequência de ETEC neles observada foi significante.

As cepas de EPEC e ETEC, isoladas de alimentos, foram em sua maioria, sensíveis aos antibióticos testados. O isolamento de algumas cepas resistentes a uma ou mais drogas, em alimentos de origem animal, pode ter sido causado pelo uso frequente de antibióticos adicionados à ração de animais, como também pelo uso indiscriminado destas drogas, na prática médica e veterinária, responsável pela seleção de cepas resistentes.

Talvez mais importante do que a frequência com que foram isoladas dos alimentos, é o fato das cepas enteropatogênicas de *E. coli* terem sido isoladas de alimentos prontos para consumo, os quais não requerem nenhum tipo de tratamento térmico adicional. Por outro lado, vários alimentos são, muitas vezes, consumidos sem terem sofrido o tratamento térmico necessário para a destruição das cepas patogênicas eventualmente presentes.

Considerando-se todos os aspectos acima mencionados, permanece ainda pouco claro o verdadeiro papel dos alimentos na disseminação de *E. coli*, responsável por surtos de diarréia no homem e em animais. Acredita-se que novos dados poderão surgir, a partir do momento em que a metodologia para isolamento e identificação de amostras enteropatogênicas em alimentos for mais adequada.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Sra. Dilma S. Gelli, da Seção de Microbiologia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento de parte das amostras de *E. coli*, ao Dr. Bernard Rowe, do Central Public Health Laboratory, de Londres, pela sorotipagem das amostras enterotoxigênicas, e à Sra. Carmen H.M. Azevedo, pelo auxílio técnico. Agradecem, também, o auxílio financeiro dado pela FINEP.

Referências Bibliográficas

1. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.W.; Sherris, G.J. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
2. Danielsson, M.L.; Möllby, R.; Brag, H.; Hanson, N.; Johsson, P.; Olsson, E. & Wadstrom, T. - Enterotoxigenic enteric bacteria in foods and outbreaks of food-borne diseases in Sweden. J. Hyg. (Camb.), 83:33-40, 1979.
3. Dean, A.G.; Ching, Y.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1972.
4. Donta, S.T.; Moon, H.W. & Whipp, S.C. - Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. Science, 183:334-335, 1974.
5. Echeverria, P.; Verhaert, L.; Basaca-Sevilla, V.; Benson, T.; Cross, J.; Ørskov, F. & Ørskov, I. - Search of heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans, livestock, food and water in a community in the Philippines. J. Infect. Dis., 138:87-90, 1978.
6. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
7. Evans, D.G. & Evans, D.J. - A new-surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. Infect. Immun., 21:638-647, 1978.
8. Evans, D.G.; Evans, D.J. & Tjoa, W. - Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. Infect. Immun., 18:330-337, 1977.

9. Fantasia, L.D.; Mistrandea, L.; Schrade, J.P. & Yager, J. - Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. *Appl. Microbiol.*, 29:179-185, 1975.
10. Fishbein, A.; Mehlman, I.J.; Chugg, L. & Olson, J.C. - Coliforms, fecal coliforms, *E. coli* and enteropathogenic *E. coli*. In: - Speck, M.L. - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, p.227, 1972.
11. Franck, J.F. & Marth, E.H. - Survey of soft and semi-soft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.*, 41:198-200, 1978.
12. Gorbach, S.L.; Kean, B.H.; Evans, D.G.; Evans, D.J. & Bessudo, D. - Travelers' diarrhea and toxicigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.*, 292:933-936, 1975.
13. Guth, B.E.C. - *Escherichia coli* enterotoxigenica: detecção através de características bioquímicas e antigênicas. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1983. (Tese de Mestrado).
14. Hall, H.E.; Brown, D.F. & Lewis, K.H. - Examination of market foods for coliform organisms. *Appl. Microbiol.*, 15:1062-1069, 1967.
15. Jiwa, S.F.H.; Krovacek, K. & Wadstrom, T. - Enterotoxigenic bacteria in food and water from an ethiopian community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:1010-1019, 1981.
16. Lányi, B.; Szita, J.; Ringelmann, B. & Kovach, K. - A water-borne outbreak of enteritis associated with *Escherichia coli* serotype 124:72:32. *Acta microbiol. Hung.*, 6:77-84, 1959.
17. Lee, J.A. & Kean, B.H. - International Conference on Diarrhea of Travelers - new directions in research: a summary. *J. Infect. Dis.*, 137:355-369, 1978.
18. Levine, M.M.; Ristaino, P.; Sack, R.B.; Kaper, J.B.; Ørskov, F. & Ørskov, I. - Colonization factor antigens I and II type I somatic pili in enterotoxigenic *Escherichia coli*: relation to enterotoxin type. *Infect. Immun.*, 39:889-897, 1983.
19. Lumish, R.M.; Ryder, R.W.; Anderson, D.C.; Wells, J.C. & Puhr, N. - Heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* induced diarrhea abroad a Miami based cruise ship. *Am. J. Epidemiol.*, 111:432-436, 1980.
20. Manzullo, A. & Estevez, F.J. - Investigaciones de *Escherichia coli* enteropatógeno en leches e cremas crudas de una zona de la ciudad de Buenos Aires. *Rev. Asoc. Med. Argent.*, 79:36-41, 1965.
21. Marier, R.; Wells, J.G.; Swanson, R.C.; Callahan, W. & Mehlman, I. - An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* food-borne disease traced to imported french cheese. *Lancet*, p. 1376-1378, 1973.
22. Mehlman, I.J. & Romero, A. - Enteropathogenic *Escherichia coli*: methods for recovery from foods. *Food Technol.*, 36:73-79, 1982.
23. Merson, M.H.; Morris, G.K.; Sack, D.A.; Wells, J.G.; Feeley, J.C.; Sack, R.B.; Greech, W.B.; Kapikian, A. & Gangarosa, E. - Travelers' diarrhea in Mexico: a prospective study of physicians and family members attending a congress. *N. Engl. J. Med.*, 294:1299-1305, 1976.
24. Merson, M.H.; Ørskov, I.; Sack, R.B.; Hug, I. & Koster, F.T. - Relationship between enterotoxin production and serotypes in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 23:325-329, 1979.
25. Ørskov, F.; Ørskov, I.; Evans, D.J.; Sack, R.B.; Sack, D.A. & Wadstrom, T. - Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhea in adults and children. *Med. Microbiol. Immun.*, 152:73-78, 1976.
26. Reis, M.H.L.; Guth, B.E.C.; Gomes, T.A.; Murahovsky, J. & Trabulsi, L.R. - Frequency of *Escherichia coli* strain producing heat-labile enterotoxin or heat-stable enterotoxin or both in children with and without diarrhea in São Paulo. *J. Clin. Microbiol.*, 15:1062-1064, 1982.
27. Reis, M.H.L.; Mattos, D.P.; Castro, A.F.P.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Relationship among enterotoxigenic phenotypes, serotypes and source of strains in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 28:24-27, 1980.
28. Reis, M.H.L.; Vasconcelos, J.C. & Trabulsi, L.R. - Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw foods from animal origin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:270-271, 1980.

29. Rosenberg, M.L.; Koplan, J.P.; Wachsmuth, I.K.; Wells, J.G.; Gangarosa, E.; Guerrant, R.L. & Sack, D.A. - Epidemic diarrhea at Crater Lake from enterotoxigenic *Escherichia coli*: a large water-borne outbreak. Ann. Inter. Med., 86:714-718, 1977.
30. Sack, D.A. & Sack, R.B. - Test for enterotoxigenic *Escherichia coli* using Y-1 adrenal cells in miniculture. Infect. Immun., 11:334-336, 1975.
31. Sack, R.B.; Sack, D.A.; Mehlman, I.J.; Ørskov, F. & Ørskov, I. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from food. J. Infect. Dis., 135:313-317, 1977.
32. Schroeder, S.A.; Caldwell, J.R.; Vernon, T.M.; White, P.C.; Granger, S.I. & Bennet, J. - A water-borne outbreak of gastroenteritis in adults associated with *Escherichia coli*. Lancet, 737-740, 1968.
33. Taylor, W.R.; Schell, W.L.; Wells, J.G.; Choi, K.; Kinnunen, D.E.; Heiser, P.T. & Helstad, A.G. - A foodborne outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. N. Engl. J. Med., 18:1093-1095, 1983.
34. Toledo, M.R.F.; Alvariza, M.C.B.; Murahovschi, J.; Ramos, S.R.T.S. & Trabulsi, L.R. - Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic diarrhea in infants. Infect. Immun., 39:586-589, 1983.
35. Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - Mili: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 13:230-235, 1982.
36. Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - EPM: uma modificação do meio de Rugai para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 13:309-315, 1982.
37. Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, Atualização em microbiologia clínica, 1981.
38. Wood, L.V.; Wolfe, W.H.; Ruiz Palacios, G.; Foshee, U.S.; Coman, L.T.; Cleskey, F.; Wright, J.A. & DuPont, H.L. - An outbreak of gastroenteritis due to a heat-labile enterotoxin producing strain of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 41:931-934, 1983.

SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS POR *Salmonella* ISOLADOS DE FARINHAS DE ORIGEM ANIMAL UTILIZADOS NO PREPARO DE RACÕES

Angelo Berchieri Junior
Antonio Carlos Paulillo

Deptº de Patologia Veterinária
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal
Campus de Jaboticabal Unesp
14870 Jaboticabal SP, Brasil

Sueli Aparecida Fernandes
Seção de Bacteriologia
Instituto Adolfo Lutz
Caixa Postal 7027
01000 São Paulo SP, brasil

Kinue Irino
& Gil Vital Alvares Pessoa
Seção de Bacteriologia
Instituto Adolfo Lutz

Resumo

Todas as cepas foram sensíveis ao cloranfenicol e sulfato de colistina e resistentes a sulfazotrim, bacitracina e penicilina; por outro lado, verificou-se resistência parcial à tetraciclina (77,1%), ácido nalidíxico (18,0%), nitrofurantoína (2,16%), amikacina (1,44%) e cefoxitina (0,7%).

Summary

*Sensitivity to 10 antimicrobial agents was tested with 139 strains of *Salmonella*, belonging to 32 serotypes, isolated from meals of animal sources*

All the strains were resistant to trimethoprin-sulfamethoxazole, bacitracin, penicillin; partial resistance to tetracycline (77,1%), nalidix acid (18,0%), nitrofurantoin (2,16%), amikacin (1,44%) and cefoxitin (0,7%), while all were sensitive to cloranfenicol and colistin sulphate.

Introdução

Os antibióticos têm sido valiosos instrumentos na luta contra os microrganismos. Muitas cepas adquiriram resistência aos agentes antimicrobianos e transferiram-na aos seus descendentes (11). Tal situação agravou-se com o uso indiscriminado de drogas em terapêutica e em ração como estimulantes de crescimento (9).

Lakhotia & Stephens (14, 15), estudando a sensibilidade de cepas de *Salmonella* isoladas de aves e de ração, a antibióticos, observaram maior percentual de resistência em cepas isoladas de perus, devido ao uso comum de ração contendo antibióticos. Vários pesquisadores (12, 13, 18) verificaram um acréscimo no isolamento de cepas resistentes aos agentes antimicrobianos, devido ao seu uso indiscriminado, em

rações para animais.

Diante da escassez de bibliografia nacional, concernente à sensibilidade a antibióticos, apresentada por salmonelas, isoladas de rações ou de seus componentes, delineou-se o presente trabalho, que tem como objetivo principal pesquisar a sensibilidade de sorotipos de *Salmonella*, eventualmente detectados em farinhas de origem animal, a diferentes agentes antimicrobianos.

Material e Métodos

Foi testada a sensibilidade de 139 cepas pertencentes a 32 sorotipos de *Salmonella*, isoladas de amostras de farinha de origem animal e destinadas à fabricação de rações (Tabela 1).

As cepas foram submetidas a testes de sensibilidade a substâncias antimicrobianas, segundo a técnica descrita por Bauer & col. (2). Foram empregados discos impregnados com 10 antimicrobianos: ácido nalidíxido (30mcg), amicacina (30mg), bacitracina (10UN), cefoxitina (30mcg), penicilina (10UN), sulfazotrim (25mcg), tetraciclina (30mcg), nitrofurantoína (300mcg), sulfato de colistina (10mcg) e cloranfenicol (30mcg).

Resultados e Discussão

O comportamento de cada cepa está registrado na Tabela 2. Todas as cepas foram resistentes a sulfazotrim, bacitracina e penicilina, com resistência parcial em diferentes níveis às drogas: tetraciclina (77,1%), ácido nalidíxico (18,0%), nitrofurantoína (2,16%), amicacina (1,44%) e cefoxitina (0,70%). Por outro lado, verificou-se sensibilidade total com relação ao sulfato de colistina e ao cloranfenicol.

Tabela 1 - Distribuição dos sorotipos de *Salmonella* de acordo com o grupo sorológico e sua frequência nas diferentes matérias primas examinadas

Grupo	Sorotipo	Farinha				Total
		Came	Pena e viscera	Pena	Viscera	
B	<i>S. bredeney</i>	8	-	-	-	-
	<i>S. agona</i>	5	1	-	-	6
	<i>S. schwarzengrund</i>	1	-	-	-	1
	<i>S. san-diego</i>	1	1	1	-	1
	<i>S. typhimurium</i>	1	-	-	-	1
	<i>S.I 4,12:i:-</i>	1	-	-	-	1
C ₁	<i>S. infantis</i> 014*	2	1	2	-	5
	<i>S. ohio</i>	5	1	-	-	5
	<i>S. montevideo</i>	4	-	1	1	4
	<i>S. tennessee</i>	2	-	-	-	2
	<i>S. tennessee</i> 014*	3	-	-	1	3
	<i>S. mbandaka</i>	-	-	2	-	1
	<i>S. mbandaka</i> 014*	-	1	-	-	1
	<i>S. inganga</i>	1	-	-	-	1
	<i>S. isangi</i> 014*	-	-	1	-	1
	<i>S. oranienburg</i>	1	-	-	-	1
C ₂	<i>S. newport</i>	1	-	-	-	1
C ₃	<i>S. kentucky</i>	8	-	-	-	8
C ₄	<i>S. einisuettel</i>	4	6	-	-	10
D ₁	<i>S. panama</i>	2	-	-	-	2
E ₁	<i>S. anatum</i>	9	-	-	-	10
	<i>S. lewington</i>	1	-	1	-	2
	<i>S. meleagridis</i>	-	1	-	-	1
	<i>S.I 3,10:1, v:-</i>	1	-	-	-	1
E ₂	<i>S. binza</i>	8	-	2	-	10
E ₄	<i>S. senftenberg</i>	1	-	-	1	5
G ₂	<i>S. havana</i>	9	7	-	1	17
	<i>S. grimpensis</i>	8	-	-	-	8
	<i>S. cubana</i>	3	-	-	-	3
H	<i>S. mabelia</i>	1	-	-	-	1
K	<i>S. cerro</i>	17	2	-	-	19
L	<i>S. minnesota</i>	1	-	-	-	1
	Total	109	17	10	2	1
	Nº sorotipos (32)	28	6	6	2	1

A resistência de salmonelas aos agentes antimicrobianos tende a um crescimento ainda maior devido a prática, atualmente muito comum, da adição de antibióticos em rações para animais, como promotores de crescimento (9, 12, 13, 14, 15, 18), o que para Van Leeuwen & col. (28) constituiu-se no principal motivo do surgimento de cepas resistentes de *Salmonella* na Holanda. Estes autores constataram que após a proibição do uso de antibióticos na ração, houve um decréscimo no número de cepas resistentes naquele país. Ainda, com relação a esse aspecto, é importante realçar que a resistência adquirida é transferível, entre as bactérias gram-negativas (10, 16).

O aparecimento de microrganismos resistentes provoca consequências indesejáveis, como o surgimento de cepas multiresistentes, de difícil controle (22) e capazes de colonizar o trato entérico dos animais e do homem, mesmo na ausência de pressão seletiva de antibióticos (11).

As salmonelas estudadas nesta pesquisa (Tabela 2) foram todas resistentes à bacitracina, à penicilina e à sulfazotrim (trimetoprim-sulfametoaxazol). Especificamente, no que concerne à bacitracina, a literatura consultada nada registra; entretanto, com relação à penicilina, os resultados desta pesquisa estão corroborados no relato de Vanderpost & Beel (27).

Todas as cepas mostraram-se resistentes à sulfazotrim, divergindo dos resultados de Duck & col. (7) e de Falbo & col. (8), cujos achados revelaram, respectivamente, sensibilidade total e resistência parcial (5,3%) à sulfazotrim.

A resistência à tetraciclina é citada na literatura consultada variando de 0 a 72% (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29); entretanto, o percentual obtido no presente estudo atingiu teto mais elevado (77,1%).

A resistência apresentada ao ácido nalidíxico (18%) também foi superior aos índices citados na literatura consultada (3, 8, 19, 21, 22, 24, 25).

O percentual de resistência que os sorotipos de *Salmonella* apresentaram à nitrofurantoína (2,16%) é similar àqueles descritos na literatura, os quais oscilaram entre zero e 2,5% (1, 6, 14, 18, 25, 26, 29); todavia níveis de resistência mais elevados já foram descritos, como o relatado (14,21%) por Coignoul & col. (5).

Tabela 2 – Número e percentual de resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* isoladas de amostras de farinha de origem animal

Sorotipos	Antimicrobianos										Total cepas
	Sulfa- zotrim 25mcg	Bacitra- cina 10 uni.	Penici- lina 30mcg	Tetra- ciclina 30mcg	Ac.nali- díxico 300mcg	Nitrofu- rantoína 300mcg	Amica- cina 30mcg	Cefoxi- tina 30mcg	Colis- tina 10mcg	Cloran- fenicol 30mcg	
<i>S. cerro</i>	19	19	19	10	0	0	0	0	0	0	19
<i>S. kavana</i>	17	17	17	12	1	0	1	0	0	0	17
<i>S. einstettel</i>	10	10	10	6	1	0	0	0	0	0	10
<i>S. binza</i>	10	10	10	9	0	0	0	0	0	0	10
<i>S. anatum</i>	10	10	10	10	3	0	0	0	0	0	10
<i>S. bredeney</i>	8	8	8	8	2	0	0	0	0	0	10
<i>S. grampensis</i>	8	8	8	4	3	0	0	0	0	0	8
<i>S. kentucky</i>	8	8	8	7	1	0	0	0	0	0	8
<i>S. agona</i>	6	6	6	5	2	0	0	0	0	0	6
<i>S. infantis</i> 014+	5	5	5	4	2	1	0	0	0	0	5
<i>S. ohio</i>	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	5
<i>S. montevideo</i>	4	4	4	4	1	0	0	0	0	0	4
<i>S. cubana</i>	3	3	3	2	3	0	0	0	0	0	3
<i>S. tennessee</i>	3	3	3	3	0	0	0	0	0	0	3
<i>S. tennessee</i> 014*	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. lexington</i>	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. panama</i>	2	2	2	2	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. senftenberg</i>	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. mbandaka</i>	2	2	2	1	0	0	0	0	0	0	2
<i>S. mbandaka</i> 014*	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. meleagridis</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. typhimurium</i>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1
<i>S. modelia</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. newport</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. stanzengrund</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>S. san-diego</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. minnesota</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. oranienburg</i>	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. isangi</i> 014*	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>S. inganga</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>S.I 3:10:1, v:-</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>S.I 4:12:i:-</i>	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
Total (n?)	139	139	139	107	25	3	2	1	0	0	139
Total (%)	100	100	100	77,1	18,0	2,16	1,44	0,7	0	0	100

Todas as cepas de *Salmonella* testadas por Cox (6) foram sensíveis à amicacina, enquanto que nesta pesquisa, foi possível notar resistência em 1,44% das cepas estudadas.

A resistência à cefoxitina foi de 0,7% e nenhuma referência a essa droga foi encontrada, em tal sentido, na literatura.

Acompanhando os níveis de resistência ao cloranfenicol, descritos na bibliografia consultada, que variam de zero a 3,45% (1, 3, 4, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 16, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 29), todas as cepas examinadas (Tabela 2), mostraram-se sensíveis ao referido antibiótico, embora havendo citações de percentuais de resistência superiores aos acima mencionados, ou sejam de 8,3% (21), 50% (8) e 67% (5).

Os relatos a respeito da sensibilidade de salmonelas ao sulfato de colistina apontam-no como um excelente antibiótico, com índices de resistência oscilando entre zero e 2,1% (6, 11, 24, 25). Tal assertiva pode ser corroborada nos dados da presente pesquisa, em que todas as salmonelas estudadas revelaram-se sensíveis ao referido antibiótico. Todavia, Pessoa & col. (21), estudando salmonelas de origem humana isoladas de coprocultura, obtiveram índices de resistência de 11,22%.

No Brasil, dentre os antimicrobianos estudados na presente pesquisa, penicilina, bacitracina, furazolidona, tetraciclina e, em menor escala, sulfato de colistina, são usualmente adicionados às reações comerciais; cloranfenicol, sulfazotrim, nitrofuranos e tetraciclina, são utilizados em terapêutica veterinária.

Considerando os dados obtidos, apenas cloranfenicol e sulfato de colistina podem ser empregados com segurança, em terapêutica veterinária. Ressalta-se também, que os níveis de resistência a antimicrobianos, apresentados pelas cepas de *Salmonella* estudadas nesta pesquisa, mais que uma sugestão de qual droga seja mais eficaz, demonstra o efeito nocivo do uso indiscriminado e inadequado dessas drogas.

Agradecimentos

Ao Laboratório CEFAR - Fármaco Diagnóstico Ltda.

Referências Bibliográficas

1. Barbour, E.K. & Nabbut, N.H. - Isolation of *Salmonella* and some other potential pathogens from two chicken-breeding farms in Saudi Arabia. Av. Dis., 26:234-244, 1982.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
3. Beaucage, C.M. & Fox, J.G. - Transmissible antibiotic resistance in *Salmonella* isolated from random-source cats purchased for use in research. Am. J. Vet. Res., 40:849-851, 1979.
4. Cherubin, C.E.; Szmuness, M. & Winter, J. - Antibiotic resistance of *Salmonella*. N.Y. State J. Med., 72:369-372, 1972.
5. Coignoul, F.; Josse, M.; Dewaele, A. & Kaekenbeeck, A. - Bilan de deux saisons d'autopsies de veaux. Ann. Med. Vet., 121:479-484, 1977.
6. Cox, H.U. - In vitro antimicrobial susceptibility of salmonellae from animals in Louisiana. Am. J. Vet. Res., 41:809-811, 1980.
7. Duck, P.D.; Dillon, J.R.; Lior, H. & Eidus, L. - Antibiotic resistance among predominant *Salmonella* serovar and phagovars in Canada. Can. J. Microbiol., 24:1358-1365, 1978.
8. Falbo, V.; Caprioli, A.; Mondello, F.; Cacace, M.L.; Luzi, S. & Greco, D. - Antimicrobial resistance among *Salmonella* isolates from hospitals in Rome. J. Hyg., 88:275-284, 1982.
9. Gardner, P. - Antibiotics in animal feeds: the need for better epidemiologic studies. J. Infec. Dis., 138:101-104, 1978.
10. Gill, F.A. & Hook, E.W. - *Salmonella* strains with transferable antimicrobial resistance. J.A.M.A., 198:1267-1269, 1966.

11. Guillot, J.F.; Chaslus-Dancla, E. & Lafont, J.P. - Spontaneous implantation of antibiotic-resistance Enterobacteriaceae in the digestive tract of chickens in the absence of selective pressure. *Antim. Ag. Chemother.*, 12:697-702, 1977.
12. Hummel, P.H. - Antibiotic resistance among *Salmonellae* isolated from animals in Tanzania. *Bull. Anim. Hlth. Prod. Afr.*, 27:113-121, 1979.
13. Ishiguro, N.; Makino, S.; Sato, G. & Ishiguro, K. - Antibiotic resistance and genetics properties of R plasmids in *Salmonella* isolates of swine in Japan. *Am. J. Vet. Res.*, 41:46-50, 1980.
14. Lakhotia, R.L. & Stephens, J.F. - Transferable drug resistance among *Salmonella* and Arizona from turkeys, chickens and feed. *Poultry Sci.*, 51:1827-1828, 1972.
15. Lakhotia, R.L. & Stephens, J.F. - Incidence of drug resistance and R-factor among salmonellae isolated from poultry. *Poultry Sci.*, 52:2266-2270, 1973.
16. Manten, A.; Guinee, P.M.A. & Kampelmacher, E.H. - Incidence of resistance to tetracycline and chloramphenicol among *Salmonella* bacteria found in the Netherlands in 1963 and in 1964. *Zbt. Bakt. I. Abt. Orig.*, 200:13-20, 1966.
17. McWhorter, A.C.; Murrell, A.R.C. & Edwards, P.R. - Resistance of salmonellae isolated in 1962 to chlortetracycline. *Appl. Microbiol.*, 11:368-370, 1963.
18. Nabbut, N.H.; Barbour, E.K. & Al-Nakhli, H.M. - In vitro susceptibility of salmonellae to eight antimicrobial agents. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig. A*, 251:190-195, 1981.
19. Neu, H.C.; Cherubin, C.E.; Longo, E.D.; Flouton, R. & Winter, J. - Antimicrobial resistance and R-factor transfer among isolates of *Salmonella* in the Northeastern States: a comparison of human and animal isolates. *J. Inf. Dis.*, 617-622, 1975.
20. Neu, H.C.; Winshell, E.B.; Winter, J. & Cherubin, C.E. - Antibiotic resistance of *Salmonella* in Northeastern United States 1968-1969. *N. State J. Med.*, 71:1196-1206, 1971.
21. Pessoa, G.V.A.; Irino, K.; Melles, C.E.A.; Calzada, C.T.; Raskin, M. & Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. II - O surto epidêmico de *Salmonella typhimurium* em São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 38:107-127, 1978.
22. Pocurull, D.W.; Gaines, S.A. & Mercer, H.D. - Survey of infectious multiple drug resistance among *Salmonella* isolated from animals in the United States. *Appl. Microbiol.*, 21:358-362, 1971.
23. Ramsey, C.H. & Edwards, P.R. - Resistance of salmonellae isolated in 1959 and 1960 tetracyclines and chloramphenicol. *Appl. Microbiol.*, 9:389-391, 1961.
24. Ryder, R.W.; Blake, P.A.; Murlin, A.C.; Carter, G.P.; Pollard, R.A.; Pearson, M.H.; Allen, S.D. & Brenner, D.J. - Increase in antibiotic resistance among isolates of *Salmonella* in the United States. *J. Inf. Dis.*, 142:485-491, 1980.
25. Schroeder, S.A.; Terry, P.M. & Bennet, J.V. - Antibiotic resistance and transfer factor in *Salmonella*, United States, 1967. *J.A.M.A.*, 205:903-906, 1968.
26. Sojka, W.J. & Hudson, E.B. - A survey of drug resistance in *Salmonella* isolated from animals in England and wales during 1972. *Brit. Vet. J.*, 121:95-104, 1976.
27. Vanderpost, J.M. & Bell, J.B. - Bacteriological investigation of alberta meat-packing plant wastes with emphasis on *Salmonella* isolation. *Appl. Envir. Microbiol.*, 33:538-545, 1977.
28. Van Leeuwen, W.J.; Van Embden, J.; Guinee, R.; Kampelmacher, E.H.; Manten, A.; Van Schoorhorst, M. & Voogd, C.E. - Decrease of drug resistance in *Salmonella* in the Netherlands. *Antim. Ag. Chemother.*, 16:237-239, 1979.
29. Voogd, C.E.; Guinee, P.A.M.; Manten, A. & Valkenburg, J.J. - Incidence of resistance to tetracycline, chloramphenicol and ampicillin among *Salmonella* species isolated in the Netherlands in 1967 and 1968. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 36:297-304, 1970.

SIMPLIFIED METHOD FOR ISOLATION OF CHLAMYDIA TRACHOMATIS USING CELLS IN SUSPENSION

Lair Guerra de Macêdo Rodrigues

Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal do Piauí
Cidade Universitária
64000 Teresina PI, Brasil

William Whittington

Center for Disease Control
Atlanta Ga, USA

& Wayne L. Greaves

Howard University
Washington D.C., USA

Summary

Standard methods for isolating *Chlamydia trachomatis* using centrifuged, cycloheximide-treated McCoy cells are expensive and time consuming. We compared the standard method to one that uses untreated McCoy cells in suspension without centrifugation or preinoculation. The standard method detected all of 22 *C. trachomatis* stock strains compared to 21 of 22 in the cell suspension method. Of 44 positive clinical specimens, 28 were detected by both methods, 11 by the standard method only, and 5 by the cell suspension method only. Unsatisfactory cultures were more common ($p<.01$) in the cell suspension method (47/214) compared to the standard method (19/214). We conclude that the cell suspension method may be a reasonable alternative to the standard method. The problem of unsatisfactory cultures needs further study.

Resumo

Método simplificado para o isolamento de Chlamydia trachomatis usando células em suspensão

O método, atualmente empregado para o isolamento de *Chlamydia trachomatis* e que requer o uso de centrifugação e células McCoy tratadas pela cycloheximide, foi comparado com um outro mais simplificado o qual não requer tratamento das células, pré-incubação e centrifugação. O método padrão detectou todas as 22 cepas da coleção estoque de *Chlamydia*, comparado com 21 detectadas pelo método das células em suspensão. Das 44 amostras clínicas positivas, 28 foram detectadas por ambos, 11 somente pelo método padrão e cinco pelo método alternativo. Culturas insatisfatórias foram detectadas mais comumente ($p<.01$) no novo método (47/214) em comparação com o método padrão (19/214). O método de células em suspensão pode ser uma alternativa razoável para o isolamento de *C. trachomatis*. O problema das culturas insatisfatórias merece um tratamento especial.

Introduction

Most often, *Chlamydia trachomatis* is isolated using a system that includes centrifuged cycloheximide-treated McCoy cells in flat bottom vials or microtiter plates (2, 5, 7). Our previous report described both the substantial cost and amount of time required to isolate *C. trachomatis* by this method in a public health laboratory (6). These factors, as well as the complexity of the standard method, led us to evaluate alternative methods for simplifying the isolation of *C. trachomatis*. In this report, we describe one alternative method using untreated McCoy cells in suspension (3, 4).

Material and Methods

The standard method utilizing centrifuged cycloheximide-treated McCoy cells and the proposed method, utilizing McCoy cells in suspension, were evaluated in two phases: (1) with specimens from stock cultures and (2) using clinical specimens from women attending and STD clinic.

Collection and handling of specimens - Twenty-two previously isolated *C. trachomatis* positive specimens were randomly selected for this evaluation. The specimens were divided into aliquots of approximately 0.5ml, and each pair of specimens was assigned different numbers from a computer-generated random number table. The investigator (WW) assigning numbers to the vials was different from the investigator interpreting the specimens (LR); and thus, the blinding of the laboratory was assured.

Cervical specimens were collected from 214 women attending the DeKalb County STD Clinic, Decatur, Georgia. Specimens were collected with cotton-tipped wooden swabs (Torrent Corp., Wisconsin). Swabs were placed into 1 x 100mm glass tube containing two ml of precooled sucrose-phosphate medium, supplemented with 10 μ g/ml gentamicin, 100 μ g/ml vancomycin, and 25U/ml nystatin. The tubes were held at 4°C and, vortexed within 1 to 2 hours. The swabs were then discarded and the specimen was aliquoted into 2 tubes, each containing approximately 8ml. These tubes were then frozen at -70°C until the study was conducted. One of the investigators, likewise, using a random number table, blinded the laboratory investigator to which specimens represented pairs.

Table 1 - Number of inclusions in cycloheximide-treated McCoy cells in monolayer and untreated McCoy cells in suspension using stock strains of *C. trachomatis*

	Number of inclusions per coverslip			
	10	10-99	>100	Total
Cycloheximide-treated McCoy cells	3	5	14	22
Untreated McCoy cells in suspension	-	8	13	21

Table 2 - Number of *Chlamydia*-positive and unsatisfactory cultures detected by cycloheximide treated McCoy cells in monolayer and untreated McCoy cells in suspension. Symbols: * = Gross bacterial or yeast contamination or >85% destruction of cells

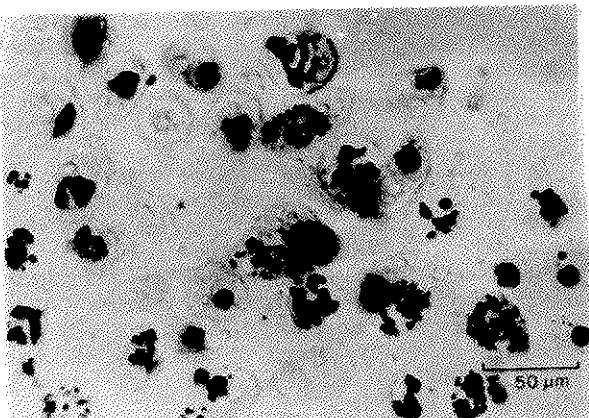
Method	Positive specimens		Unsatisfactory specimens*
	Women (N=214)	Women (N=214)	Women (N=214)
Monolayer (+)			
cell suspension (+)	28 (13%)		12 (5.61%)
Monolayer (+)			
cell suspension (-)	11 (5.14%)		07 (3.27%)
Monolayer (-)			
cell suspension (+)	05 (2.34%)		35 (16.3%)
Total	44 (20.5%)		54 (25.0%)

Table 3 - Comparison of time needed to culture clinical specimens for *Chlamydia trachomatis* using the cell monolayer and cells in suspension methods.

Symbols: * = Assuming 2 vials per specimen for 100 specimens

Steps	Cell monolayer	Cells in suspension
	Cycloheximide Treatment	No treatment
	Time (hours)	
Incubation of seeded vials	72	0
Inoculation of specimens*	1	1
Centrifugation	1	0
Treatment of cells and replacement of medium	1	0
Incubation period after inoculation	48	48
Iodine staining*	2	2
Reading of stained monolayer	20	20
Total	145	71

Figure 1 - Inclusions bodies in untreated McCoy cells, cells in suspension method, 48 hours, iodine stain



Media and cells - For both phases of the trial, McCoy cells were obtained from CDC's cell culture laboratory and were grown in Eagle's CDC modified medium with Earle salts, supplemented with 2mM L-glutamine, 10 percent heat-inactivated fetal bovine serum (pretested for chlamydial antibodies), 50µg of gentamicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) per ml, 2µg of amphotericin B (E.R. Squibb and Sons) per ml, and 7.5 percent sodium bicarbonate so as to adjust the pH from 7.2 to 7.4. For the inoculation of both stock cultures and clinical specimens, the growth medium was further supplemented with Hepes buffer (0.02ml) and 0.06 percent glucose. Cycloheximide (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) was used for treatment of cells in the standard method.

Cell monolayer method - One ml of growth medium containing 1.5×10^5 cells was dispensed onto 12mm N° 1 thickness, glass cover slips (Bellco Glass Co., Decatur, Georgia). The vials were incubated at 36°C for 72 hours. Before inoculation of the laboratory of clinical specimen, the medium was discarded, and 0.1ml of the inoculum was added to the monolayers. Specimens were then centrifuged for 1 hour at 3,000g at 36°C. Fresh medium containing cycloheximide 2µg/ml was added to each vial, and specimens were then incubated for 48 hours prior to staining and reading.

Cell suspension method - Cells were kept constantly spinning in a round flexa-mix magnetic stirrer at low speed during inoculation. One ml of medium containing 1.5×10^5 cells/ml was seeded into 1-dram vials with 12mm cover slips. Vials were immediately inoculated with 0.1ml of the laboratory clinical specimens in 2-SP medium and the cells allowed to settle. Specimens were then incubated for 48 hours at 36°C prior to staining and reading. All specimens were stained by the iodine method described in the CDC manual for chlamydia isolation (2).

Statistical analysis - Chi square contingency table analysis was used to test for differences in positive cultures and unsatisfactory cultures between the cell suspension method and the monolayer methods.

Results

There was no statistical difference in the ability of each method to isolated chlamydia from stock cultures. Twenty-one of 22 positives were detected using the cell suspension method; all 22 were identified using the standard cell monolayer method. Likewise, there was no statistical difference in the numbers of inclusion forming units when the two methods were used ($p < .4$) (Table 1). The number of inclusions with the standard method ranged from 4 to 1,445 per coverslip (mean count = 504.28). In the untreated cells methods, the number of inclusions ranged from 12 to 1,562 (mean count = 450.14).

In the evaluation of clinical specimens, 44 women were positive by one or both methods (Table 2). The cells in suspension method detected 33 of these positives, whereas the monolayer method detected 39 positives ($p > .2000$). Eleven specimens were positive by the standard method only, five were positive by the untreated cells in suspension method only, and 28 were positive by both methods (Table 2). Except for smaller and darker inclusion bodies in the cycloheximide-treated cells, the appearance and morphology of the cells in the cell suspension method were similar to those in the standard method. The cells were elongated and separated with a large cytoplasm. Inclusion bodies were dark, granular, and well-centered in the cytoplasm (Fig. 1).

A significant difference in the proportion of cultures that was reported as unsatisfactory (gross bacterial or yeast contamination or destruction of greater than 85% of the cells) occurred between the two methods. In the cells in suspension method, 47 of 214 specimens were unsatisfactory when compared to 19 of 214 in the monolayer method ($p < .01$).

Discussion

All currently available cell culture methods for the isolation of *C. trachomatis* use centrifugation of specimens into cells already in monolayers (1, 2, 5). Centrifugation is believed to change cell surface characteristics and enhance chlamydial infection of the cells (1). The centrifugation cell culture method, however, is time-consuming and requires expensive centrifuges, which makes the isolation of chlamydia impractical in many laboratories in the United States and developing countries.

In this study, we explored an alternative technique, using cells in suspension without centrifugation as an in vitro model for infection in vivo. We found that cells, when kept in suspension, were as suitable for chlamydial infection and propagation as cells used in the centrifuge-assisted method. Similar findings have been reported by Harper & col. (3) and Reddish & col. (4). The cells in suspension method eliminates three major steps from the usual cell culture approach (Table 3). First, after seeding the vials, incubation for 72 hours is omitted; second, specimens are not centrifuged after inoculation; and third, the treatment of cells and replacement of the medium are not required. Based on our previous experience (6) it is possible to report results of chlamydial cultures at least 72 hours earlier, thereby potentially contributing to improved patient management.

The difference in the proportion of cultures that was either grossly contaminated or that had virtually complete destruction of cells is not easily explained. The absence of centrifugation and replacement of the medium in the cell suspension method may have contributed to the excess proportion of cultures that were reported as unsatisfactory. To solve this problem we suggest centrifugation (for 10 minutes at 800rpm) of specimens considered unsatisfactory (due to acidity or turbidity) before inoculation.

Although the sensitivities of the two methods appear equivalent, neither method detected more than 84 percent of the total number of positive specimens. It is clear, therefore, that current cell culture techniques are less than optimally sensitive for chlamydia detection.

In summary, this study shows that the traditional cell culture system for the identification of *Chlamydia trachomatis* can be simplified without a significant

loss in sensitivity. In addition to the advantages of reduced cost and increased simplicity, this method may allow for a high antigen yielding system (3), since isolates may be passed repeatedly in plastic flasks, producing many inclusions. Further evaluation of this method is necessary, however, to better define and, address the problem of contaminated cultures.

References

1. Allan, I. & Pearce, J.H. - Modulation by centrifugation of cell susceptibility to chlamydia infection. *J. Gen. Microbiol.*, 111:87-89, 1979.
2. Bird, B.; Forrester, T.C. - Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. Atlanta, Georgia, U.S. Dept. of Health, Education and Welfare, Center for Disease Control, 1980.
3. Harper, I.A.; Johnson, L. & Thompson, R.G. - Culture of chlamydia. *J. Clin. Path.*, 35:365-366, 1982.
4. Reddish, M.A.; Stuart, E.S.; Than, K.A. & MacDonald, A.B. - The isolation and propagation of *Chlamydia trachomatis* in M-1 cells. Abstract n° 84 presented at the 5th International Meeting of the International Society for STD Research, Seattle, Washington, 1983.
5. Ripa, R.T.; Mardh, P.A. - Cultivation for *Chlamydia trachomatis* in cycloheximide-treated McCoy cells. *J. Clin. Microbiol.*, p.328-331, 1977.
6. Rodrigues, L.G.; Bird, B.R. & Kraus, S.J. - Resources needed to culture *Chlamydia trachomatis* in laboratories of clinics for sexually transmitted diseases. *Sex. Transm. Dis.*, p.80-83, 1981.
7. Yoder, B.L.; Stamm, W.B.; Koester, C.M. & Alexander, E.R. - Microtest procedure for isolation of *Chlamydia trachomatis*. *J. Clin. Microbiol.*, 13:1036-1039, 1981.

VACCINIA VIRUS-INDUCED UNSATURATION OF C18 FATTY ACIDS IN VERO CELLS

Carlos Mitihiko Nozawa

Institute of Microbiology
Federal University of Rio de Janeiro
Caixa Postal 68040
20000 Rio de Janeiro RJ, Brazil

& Kostadin Apostolov

Department of Virology
Royal Postgraduate Medical School
London England

Summary

Change in the saturation of eighteen-carbon fatty acids (C18) of cell culture was studied after *Vaccinia* virus infection. It is shown that *Vaccinia* virus produces a relative decrease in the saturation of C18 fatty acids as detected by gas-liquid chromatography. This change was observed 2h after infection with high multiplicity of infection. Alteration in the host cell membrane properties due to desaturation of fatty acid constituent is discussed in terms of the cytopathic effect and cell permeability.

Resumo

Insaturação de ácidos graxos C18 induzida pelo vírus Vaccinia em células vero

As alterações na saturação de ácidos graxos de dezoito carbonos de cultura de células foram estudadas após a infecção com o vírus *Vaccinia*. O estudo por cromatografia líquido-gasosa mostrou que o vírus produz uma relativa diminuição na saturação dos ácidos graxos C18. Este efeito foi observado 2 horas após a infecção com alta multiplicidade de infecção. As alterações nas propriedades de membrana de células hospedeiras causadas pela dessaturação de ácidos graxos, são discutidas em termos de efeito citopático e permeabilidade celular.

Introduction

The physical state of membrane lipids has been shown to be an important factor in many cellular processes. The long chain fatty acids (FA) with 16 (C16) and 18 (C18) carbon atoms make up 70-80% of the FA extractable from the lipids of animal cell. The physical properties of the biological membranes, v.g. fluidity, dependent significantly on the carbon chain length and the degree of saturation of the constituent FA. For example, the melting point of the saturated C18FA (C18:0), stearic acid is 69°C, while its unsaturated counterpart with one double bond (C18:1) oleic acid is 14°C (3). It has shown that catalytic hydrogenation of unsaturated FA leads to decreased membrane mobility (2).

It was recently found that viruses affect the saturation of the FA in infected cells. Virulent strains of Newcastle disease virus (NDV) produced a drastic and progressive increase in unsaturated FA, while the avirulent strains failed to do so. It was suggested that the higher fusogenic capacity of the virulent strains was a function of higher mobility of the cell membrane due to increase of unsaturation (1). It was also found that Sindbis and Coxsackie viruses induced the opposite effect, viz. a reversible increase in the saturation of the C18FA (5, 6). In this study we show that *Vaccinia* virus causes a relative increased unsaturation of the C18FA.

Material and Methods

Cells and virus - The seed of vero cells was purchased from Flow Laboratories, U.K. and used at passage 30. The cells were grown in Eagle's MEM supplemented with 5% foetal calf serum (FCS), (Gibco Europe, Glasgow).

Vaccinia virus strain IDW (fusogenic strain) was supplied by the clinical laboratory of the Department of Virology of the Royal Postgraduate Medical School. It was grown in vero cells to titre of 0.5×10^7 PFU/ml.

Infection of the cell cultures - A serie of 25cm² tissue culture flasks (Falcon, USA), containing monolayers of vero cells at approximately 70% confluence was infected with *Vaccinia* virus at m.o.i. of 50, after washing once with warm PBSA. The cultures were maintained at room temperature for an hour for adsorption. For control, several cultures were mock infected. After adsorption cell sheets were washed three times with warm PBSA and overlaid with 4ml of prewarmed maintenance medium, supplemented with 0.5% FCS and 25mM of Hepes buffer, and incubated at 37°C. At timed intervals the supernatant fluids of the cultures were harvested and kept at -70°C for plaque assay and the cell sheets washed with cold PBSA and harvested with 4ml of PBSA. Following three consecutive cycles of freezing and thawing of the cultures the samples were extracted by organic solvents. Non-infected cultures were processed in the same way.

Gas-liquid chromatography (GLC) - The FA of the homogenized cultures were extracted, saponified and methylated as previously described (6).

The FA methyl esters were separated by GLC in a Pye Unicam chromatograph series 204. Matched 1.4m x 4mm i.d. glass columns (Pye Unicam, UK) packed with 3% OV1 (dimethyl silicone gum - Applied Science Lab., Penn., USA) on 100/200 mesh Chromosorb Q (Applied Science Lab., Penn. USA) were used. The temperature was programmed for an initial 4-minute isothermal period of 160°C followed by a rise of 4°C/min to 240°C. Nitrogen was used as the carrier gas at a flow rate of 30ml/min. and detection of FA methyl esters was by flame ionisation. Identification of FA was by comparison of retention times and co-chromatography with authentic FA methyl esters (Sigma Chem. Co., USA). The ratio of peak area of saturated C18FA (C18sat.) over the combined peaks of the unsaturated C18FA (C18unsat.) is referred to Saturation Index (SI), and the peak areas were worked out as previously described (5).

Chromium release and plaque assay - The methods for detecting chromium release and for plaque assay were performed as previously described (5).

Results

In order to study the effect of DNA - containing virus on the C18FA of the host cells we chose *Vaccinia* virus/vero cell system, for the virus possesses a pseudo-envelope and is highly lytic to this cell culture. Fig. 1 shows that *Vaccinia* virus produced a decrease in the C18 Saturation Index (C18SI) during the course of infection. The continuous decrease in C18SI was observed 2h after infection up to 14h when it stabilized at a C18SI of about 1.0, and remained

constant up to 24h p.i. The level of C18SI in the control cells remained constant throughout the experiment at about 1.7. It is shown that at the m.o.i. used in the experiments the CPE appeared (indicated by arrow) by the time the decrease in the C18SI was first detected, i.e. 4h after infection. Infectious virus started to be released in the supernatant fluid 6h after infection and this was followed by an exponential phase in virus growth up to 14h. By 24h a maximal titre of approximately 10^7 PFU/ml was detected. The abnormal leakage of radioactive chromium was observed when CPE appeared and over the next 20h p.i. approximately 85% of the radioactivity incorporated in the infected cells were released. It is noteworthy that abnormal leakage of chromium preceded the release of infectious virus.

Discussion

It is of vital importance that cells keep their membrane in optimal physiological conditions in order to preserve membrane-associated processes and to secure cell integrity. Biological membrane studies have shown that lipids of membrane play an outstanding role in its fluidity. The fluidity of membrane depends largely on the degree of saturation of the constituent FA.

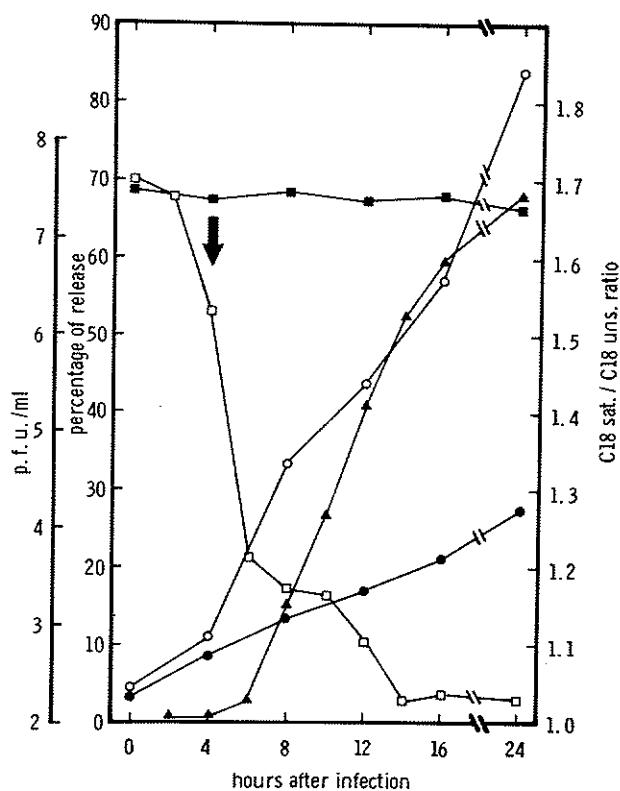
The present study has revealed that highly fusogenic strain of *Vaccinia* virus produced a relative increase in unsaturated C18FA of infected cells. Similar result was previously obtained in chicken cells infected with fowlpox virus (4). Both studies seem to indicate that viruses of the same family induce similar effect on the FA.

The desaturating effect of *Vaccinia* virus on the C18FA of the host cell may be associated to the fusion process due to increase fluidity of *Vaccinia* virus-infected cell membrane. This finding is supported by a drastic and progressive increase in unsaturated FA of Newcastle disease virus (NDV)-infected cells which correlated well with their greater fusogenicity (1).

It is interesting that in *Vaccinia* virus-infected vero cells (Fig. 1) the decrease in C18SI is followed by the release of infectious virus particles which shows that the desaturating effect is

Figure 1 - Kinetics of C18sat./C18unsat. ratio, virus replication and cell leakage in *Vaccinia* virus-infected vero cells.

Symbols: The cells were infected with 50 PFU/cell and yields of virus were determined at the indicated intervals (Δ); ^{51}Cr release counts in infected (\circ) and control cells (\bullet); the Saturation Index (C18sat./C18unsat.) was obtained by gas-liquid chromatography in infected (\square) and control cells (\blacksquare); arrow indicates the time cytopathic effect was first detected



dependent on viral replication. The reason why SI stabilizes after 14h p.i. is not known although virus particles were still produced.

The decrease in SI is followed by an exponential increase in virus yield which could mean that increased fluidity of the membrane enhances virus budding and therefore release of infective particles. The cytopathic effect represented by rounding and fusion of the cells showed a close association with the changes in FA. The high capacity of syncytia production in *Vaccinia* virus-infected cells is possibly due to increased membrane mobility as suggested elsewhere (1). The combining fluidity and mobility of the cell membrane brought about by *Vaccinia* virus unsaturating effect may induce overleakage of cell content as detected by chromium release assay. It is therefore suggested that the replication of *Vaccinia* virus alters FA saturation early in infection which in its turn induces changes in cell morphology including syncytia formation and increased cell permeability.

Acknowledgments

We wish to thank CAPES and UFRJ (Brazil) for financial support.

References

1. Blenkharn, J.I. & Apostolov, K. - The correlations of fatty acid content of infected cells and virions with Newcastle disease virus (NDV) virulence. *J. Gen. Virol.*, 52:355-358, 1981.
2. Chapman, D. & Quinn, D.J. - A method for the modulation of membrane fluidity: homogenous catalytic hydrogenation of phospholipids and phospholipids: water model biomembranes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (USA)*, 73:3971-3975, 1976.
3. Garton, G.A. - In: - Dawson, R.M.; Elliot, D.C.; Elliot, W.H. & Jones, K.M., eds. - Data for biochemical research. Oxford, Clarendon Press, p.264-268, 1969.
4. Lyles, D.S.; Randall, C.C.; Gafford, L.G. & White Jr., H.B. - Cellular fatty acids during fowlpox virus infection of three different host systems. *Virology*, 70:227-229, 1976.
5. Nozawa, C.M. & Apostolov, K. - Association of the cytopathic effect of Sindbis virus with increased fatty acid saturation. *J. Gen. Virol.*, 59:219-222, 1982.
6. Nozawa, C.M. & Apostolov, K. - Increase in the saturation of C18 fatty acids induced by Coxsackie B6 virus in vero cells. *Virology*, 120:247-250, 1982.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Clark, D.P.; Lorowitz, W. & Cronan Jr., J.E. - Genetic deregulation of ethanol-related genes. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, S.; Konisky, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S., eds. - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Basic Life Sciences, vol. 19, p.363-369, 1981.

Os autores obtiveram mutantes de *Escherichia coli* capazes de usar etanol, algumas como fonte de acetato e outras, também, como única fonte de carbono. Essas mutantes (*adhC*) produzem alcooldesidrogenase (ADH) e acetaldeído CoA desidrogenase (ACDH), em altos níveis, tanto em aerobiose como em anaerobiose.

É estudado o efeito repressor de nitrato sobre a produção das enzimas citadas, bem como o efeito repressor da mutação *adhC* sobre a produção de nitrato redutase.

Os autores sugerem, usando resultados próprios, bem como da literatura, que ADH e ACDH têm alguma interação estrutural e mostram que ACDH só é ativa quando associada a ADH. Essas enzimas constituiriam um sistema de segurança das células contra acumulação do tóxico acetaldeído.

No capítulo se estudam aspectos da regulação do uso de etanol por *E. coli* e os autores perguntam se essa bactéria não poderia ser usada para produzir etanol. Afirmando possuir cepas de *E. coli* resistentes a 6% (m/v?) de etanol a 37°C e que seria possível a seleção de cepas ainda mais tolerantes. Lembram que *E. coli* cresce bem em meios com xilose; que esse carboidrato exerce uma repressão catabólica mínima, e assim, não afeta os níveis de ADH e ACDH, o que abre a interessante possibilidade de produção de etanol em meios de xilanase (certamente após sua hidrólise) - abundante produto do processamento de madeira.

A leitura atenta do capítulo aqui comentado, pode sugerir boas idéias de pesquisas, principalmente no campo da genética microbiana aplicada à tecnologia das fermentações.

José Otamar Falcão de Moraes
Deptº de Antibióticos UFPE
Cidade Universitária
50000 Recife PE

Coats, J.H. - Models for genetic manipulation of *Actinomycetes*. In: - Hollaender, A.; DeMoss, R.D.; Kaplan, J.; Savage, D. & Wolfe, R.S., eds. - Genetic engineering of microorganisms for chemicals. New York, Plenum Press, Basic Life Sciences, vol. 19, p.133-142, 1981.

O autor comenta inicialmente, que recombinação genética tem sido difícil demonstrar com actinomicetos até recentemente, em que pese, que mais de 3.000 antibióticos, incluindo a maioria daqueles de utilidade clínica, são produzidos principalmente por cinco gêneros desses microrganismos (*Micromonospora*, *Nocardia*, *Streptoverticillium*, *Streptosporangium*, *Streptomyces*).

Estudos pioneiros, e de resultados ainda limitados, são citados em relação aos métodos de conjugação, fusão de protoplastos, transformação e transdução, no relativo a recombinação genética.

As técnicas de clonagem de DNA em *Streptomyces* são referidas com um pouco mais de ênfase, tanto com a utilização de plasmídios como de actinofágos como vetores. Os resultados mais interessantes quanto a plasmídios, são devidos a dois desses elementos que, embora cripticos, revelam sua presença em um receptor transformado, por um processo designado "Zigoze letal", que se traduz por zonas estreitas de inibição ("pocks") em torno das colônias portadoras dos plasmídios, no crescimento de estípites não portadoras. O processo não envolveria antibiose, mas implica em contato entre as hifas, podendo representar um estágio de conjugação.

Em suas conclusões o artigo torna-se especulativo quanto ao potencial das técnicas revistas, visando particularmente a melhoria nos aspectos industriais da produção de antibióticos, devido a modificações ou aumento de rendimento pelos microrganismos produtores, além de dizer da expectativa de se poder expressar o DNA de actinomicetos em *Escherichia coli*, pelo encontro de um vetor adequado.

Italo Suassuna
Faculdade de Ciências Médicas UERJ
Serviço de Microbiologia
R. Prof. Manuel de Abreu, 48
20550 Rio de Janeiro RJ

Cole, J.A.; Knowles, C.J. & Schessinger, D., eds. - *Aspects of microbiology*. USA, American Society for Microbiology, 1982.

A Sociedade Americana de Microbiologia, iniciou a publicação de uma série de pequenos livros, cujo objetivo é preencher um vazio existente, para os americanos, entre os estudantes do 2º ciclo e universitários. Para nós, no Brasil, que temos pouca ou nenhuma preocupação com a divulgação da microbiologia a nível colegial (2º ciclo), esta série não tem esta finalidade, mas sem dúvida serve para os professores e principalmente estudantes de pós-graduação em microbiologia.

Os livros e os respectivos autores desta série são: Oral microbiology, P. Marsh; Bacterial toxins, J. Stephen & R.A. Pietrowski; The microbial cell cycle, C. Edwards; Bacterial plasmids, K. Hardy; Bacterial respiration and photosynthesis, C.W. Jones; Bacterial cell structure, H.J. Rogers; Microbial control and plant pests and diseases, J. Deacon; Methylotrophy and methanogenesis, P.J. Large.

Uma das características salientadas pelos editores da série é que os livros devam ser didáticos, a ponto de mostrar porque cientistas e professores são e estão entusiasmados com a microbiologia, ao lado de apresentar os assuntos numa profundidade compatível com a formação do público que desejam alcançar, os pós-colegiais e os pré-universitários. Curiosamente alguns livros são de temas amplos, como Oral microbiology e outros específicos, como o Microbial cell cycle, mas sempre orientados no sentido de serem de fácil entendimento, atualizados e salientando os limites do conhecimento naquele campo.

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

Setlow, J.K. & Hollaender, A., eds. - *Genetic engineering: principles and methods*. New York, Plenum Press, vol. 3, 346p., 1981. US\$ 37.50.

Este é o terceiro volume de uma série que tem como objetivo acompanhar os recentes avanços na área de engenharia genética. A própria natureza dessa série, que prevê uma rápida transferência de dados obtidos nos laboratórios de pesquisa para o leitor em um período de tempo relativamente curto, leva a uma impressão de qualidade de pobre com poucas ilustrações. Isso é compensado, entretanto, pelo conteúdo de excelente qualidade. São doze capítulos que abrangem temas gerais como o uso de computador no sequenciamento e armazenamento de sequências em ácidos nucléicos até capítulos específicos abrangendo desde vírus até genomas humanos. Cincoenta por cento do livro é dedicado aos microrganismos, incluindo vírus, tripanosomas, bactérias, leveduras e mixomicetos. Novas técnicas, como por exemplo, a de obtenção de sequências de DNA mutantes "in vitro" e sua substituição em pontos específicos do DNA de células de modo a obter "mutações dirigidas" são expostas e discutidas com detalhes. O segundo capítulo consta de uma revisão atual e muito clara do elemento de inserção *l*s1 e abrange tópicos que vão desde sua detecção em células bacterianas até os possíveis modos de sua evolução e sua importância na resistência múltipla de bactérias a drogas e produção de enterotoxinas. No capítulo sobre clonagem molecular em leveduras, são vistas as vantagens desses seres para tal tipo de estudos, bem como as perspectivas futuras do sistema. Referente ao *Dictyostelium discoideum*, após uma revisão de sua biologia discute-se seu genoma e especialmente os genes de

Actina e Discoidina, esta última responsável pela coesão célula-célula nessa espécie.

À semelhança dos dois volumes anteriores, o livro é de excelente nível e deve ser recomendado a todos os que se interessam pelo assunto. É pena que o título da série não refletiu até agora o conteúdo. Nesses três primeiros volumes é dada ênfase muito grande a apenas um dos aspectos da engenharia genética, ou seja, a tecnologia do DNA recombinante. No entanto, espera-se que uma maior amplitude de temas seja incluído nos próximos volumes.

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

Skotnicki, M.L.; Lee, K.J.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - Genetic alteration of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. 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.271-290, 1981.

A bactéria *Zymomonas mobilis* vem despertando o interesse de biotecnologistas e de bioquímicos de vários países, especialmente a partir de 1979, quando P.L. Rogers e seus colegas da Universidade de New South Wales, Austrália, mostraram que as velocidades específicas de produção de etanol e de consumo de açúcar são três ou mais vezes maiores para *Zymomonas* que para leveduras alcoólicas. Outras boas qualidades das *Zymomonas*, que levam a se pensar no seu emprego industrial, são: elevada resistência a etanol e capacidade de fermentar até em temperatura de 40°C. Aspectos que podem limitar o uso dessa bactéria na produção de etanol são: espectro de fermentação estreito (só fermentam glicose, frutose e, com menos facilidade, sacarose); geralmente produzem um polímero de frutose, levana, em meios que contêm sacarose.

No capítulo aqui comentado, os autores relatam suas tentativas de melhoramento de cepas de *Zymomonas mobilis*. Inicialmente, fizeram um estudo comparativo de fermentações em meios com glicose e com sacarose, separadamente, partindo de onze amostras da bactéria. A melhor cepa (ZM-4 = CP-4) foi submetida a agentes mutagênicos (UV e nitrosoguanidina) bem como a seleção de colônias resistentes a rifampicina e a etanol. A partir de mutantes possuidores de alguma vantagem sobre a CP-4 original (recordese que esta foi isolada em 1970, em Pernambuco, por Oswaldo Gonçalves de Lima & col., a partir de caldo de cana fermentado), os autores tentaram obter cepas flokulantes ou resistentes a melago, ou resistentes a temperaturas superiores a 40°C. A seguir, dão resultados de outros experimentos em que verificaram a presença de plasmídios em várias cepas de *Zymomonas* e mostraram que esses plasmídios podem ser transferidos a outras *Zymomonas*, bem como, a cepas de gêneros diferentes, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Mostraram, ainda, que plasmídios dessas últimas bactérias puderam ser recebidos por *Zymomonas*, em frequências bastante altas (4×10^{-1} a 4×10^{-4}). Esses achados são promissores para obtenção de cepas de (*Zymomonas*?), capazes, por exemplo, de fermentar pentoses, maltose, amido e mesmo celulose.

Trata-se, como se vê, de importante capítulo da obra editada por Hollaender & col., o qual deve ser lido por quem se interessa por fermentação alcoólica, por *Zymomonas mobilis* e por melhoramento genético de microrganismos em geral.

José Otamar Falcão de Moraes
Deptº de Antibióticos UFPE
Cidade Universitária
50000 Recife PE

Zinder, N.D., ed. - RNA phages. New York, Cold Spring Harbor Laboratories, 428p., 1975.

O livro pertence à série de monografias publicadas pelo Cold Spring Harbor Laboratory e trata da biologia molecular dos RNA-bacteriófagos em 14 capítulos, cada um deles escrito por destacados especialistas no assunto, que concluem com uma bibliografia completa. O editor, Norton Zinder, foi o primeiro a estudar estes fagos no final da década de 50, juntamente com Tim Loeb.

Nesta obra, que pretende revisar e atualizar os conhecimentos neste campo, os assuntos são dispostos segundo uma sequência lógica que dá ao livro um agradável aspecto didático. Deste modo, desenvolvem-se os temas de estrutura e propriedades dos RNA-fagos e seus componentes, o ciclo infeccioso, a replicação do RNA viral, a replicase viral, a síntese de proteínas durante o ciclo infeccioso e a genética e morfogênese dos RNA-fagos.

O livro é de extraordinária importância para o especialista e sua leitura necessária para todo aquele engajado na biologia molecular (bioquímicos, biofísicos, virologistas, geneticistas, etc), bem como ao leitor que deseja aperfeiçoar seus conhecimentos neste domínio. Digo isso, por considerar esta obra não apenas importante no que tange ao conhecimento dos fagos e vírus de um modo geral, mas também pela contribuição que traz pelos fatos e idéias. É, sem dúvida alguma, uma obra que atinge todos os seus objetivos e um livro para constante referência.

"RNA phages" faz parte do ciclo de revisões sobre bacteriófagos publicadas pelo Cold Spring Harbor: The bacteriophage lambda, Lambda II, The single-stranded DNA phages, The Bacteriophage T4 e Phage and the origins of molecular biology. Nenhum outro ramo da virologia está tão bem suprido e documentado quanto o da virologia de fagos.

Creio que podemos considerar os RNA-fagos como o "quantum" genético da natureza: sua estrutura comporta informação mínima para que um sistema se replique e se organize estruturalmente em torno de um genoma, mesmo como vírus. De um modo geral, este genoma comporta 3 genes codificando duas proteínas estruturais e uma replicase. Este genoma é um RNA de fita única pesando cerca de 1 megadálton (sabe-se atualmente de fagos contendo RNA genômico duplo e fragmentado) com um alto grau de pareamento interno que, interagindo com o sistema ribossomal da bactéria hospedeira, cria uma lei de interação que gera um controle de transcrição a nível inteiramente físico e probabilístico.

Os grupos de RNA-fagos estudados neste livro são o QB e a família R17, que se desenvolvem no sistema hospedeiro *E. coli* F⁺ ou Hfr. Estes grupos são muito semelhantes quanto às suas propriedades gerais e diferem essencialmente quanto à sorologia. Suas proteínas (180 por capsídeo, uma delas, a proteína A, difere quimicamente das demais) estão sequenciadas e se organizam segundo um arranjo de simetria icosaédrica descrito como 20 grupos anulares de 9 proteínas. O RNA genômico, também sequenciado, tem suas estruturas secundária e terciária igualmente descritas. A fisico-química destes fagos tem alguns pontos bastante importantes, como por exemplo, o conteúdo de água por partícula (1 a 1,2g de água por g de vírus) que sugere ser o interior do vírion vazio, com o RNA genômico rebatido contra a face interna do capsídeo, o que nos evoca interessantes idéias sobre a evolução de vírus com capsídeo icosaédrico e que recentemente tenho desenvolvido. A genética destes fagos tem recorrido com frequência aos experimentos de sequenciamento, pois, a ausência de recombinação nos RNA-fagos dificulta sua análise segundo os métodos da genética formal. O ciclo infeccioso é exaustivamente descrito: a penetração do RNA viral (os receptores bacterianos estão associados aos pili F), a replicação do RNA viral e a estrutura e função da sua replicase, a função do RNA viral como template, os fatores proteicos necessários à replicação do RNA viral, o reconhecimento ribossomal das regiões iniciadoras do RNA genômico e, finalmente, a regulação (*in vitro*) da síntese de proteínas destes fagos pela estrutura terciária do seu RNA. A morfogênese da partícula a partir dos seus componentes primários é apresentada em todos os seus detalhes. O livro conclui com um capítulo dedicado a outros RNA-fagos diferentes das famílias estudadas (QB e R17) e de outros sistemas hospedeiros.

Temos assim, a descrição completa de um sistema biológico que nos dá um nível de informação excelente para instrumento de raciocínio, extrações e novas idéias

de pesquisas. O livro "RNA phages" completa a biblioteca do especialista e, por seu caráter interdisciplinar, é bem unido à todas as bibliotecas, direta ou indiretamente relacionadas à biologia molecular.

Fernando Portela Câmara
Instituto de Biofísica UFRJ
Bloco G - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

International Society for Evolutionary Protistology. Carta encaminhada à Sociedade Brasileira de Microbiologia, por seu presidente I.B. Heath.

Dear colleague,

On the basis of your past or present work we believe that you may have some interests in common with our Society. We are primarily interested in promoting the study of the assemblage of organisms known as the Protists. More people who might more traditionally consider themselves as protozoologists, phycologists and mycologists. Our primary means of achieving this is via the organization of biennial meetings centered on specific themes revolving around the general concept of the evolutionary relationships among the protists. The techniques most used by our members primarily fall in the realms of cell and molecular biology but levels of investigation ranging from classical morphology through ecology, population biology and genetics to chemistry all find a comfortable home within the group. Previous meetings of the group have been held in Boston, Toronto, Maryland and Southern France. Our next meeting will be held in Ottawa in 1985 (see enclosed circular) and will focus on Molecular Sistematics. In addition to our meetings, the proceedings of which have been published in the international journals "BioSystems" and "Origins of Life", we publish a Newsletter which keeps members informed of items of interest to Protistologists, including upcoming meetings, recent publications, book reviews, discussion letters and general gossip.

The Society is growing in membership and scope as the research community gradually evolves from the traditionally rather narrowly focussed disciplines to accept the merits of considering possible relationships across diverse organisms at the unicellular level of organization. If you feel you have some interest in our activities and philosophy, why don't you consider joining the Society, participating in futures meetings and contributing to the newsletter with views, reviews or general comments of interest to the membership. Membership details are enclosed for your convenience and our dues are modest by current standards.

International Society for Evolutionary Protistology, Sixth Biennial Meeting, Carleton University, Ottawa, Canada, June, 10-14, 1985.

Symposium: Molecular systematics and cellular evolution

Tentative Program - subject areas and speakers

Session I - The molecular approach to the study of evolution: problems and potential

- Cellulase gene diversity in prokaryotic and eukaryotic organisms, V.L. Seligy, National Research Council of Canada, Ottawa, Canada.
- Acting in protistan evolution, D. Gallwitz, Institut für Physiologische Chemie, Marburg, Germany.
- Evolution of chloroplast genome structure in green algae, C. Lemieux, Université Laval, Québec.
- Functional vs. structural changes in cytochrome-c: which drives which? E. Margoliash, Northwestern University, Illinois.

Session II - The impact of molecular biology on traditional theories of evolution

- The prokaryote - eukaryote interface

- Evolution of tubulins, M. Little, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany
- Mitochondrial tRNA, R.J. Cedergren, Université de Montréal.
- Evolution of eukaryotic organisms from the perspective of 5S and 5.8S rRNAs, W.F. Walker, Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia.

Chairpersons: L. Margulis, Boston University and M.A. Ragan, National Research Council of Canada, Halifax.

6th Symposium for Biotechnology for Fuels and Chemicals, Gatlinburg, Tennessee, maio, 1984.

O evento contou com 85 contribuições, repartidas entre conferências, sessão de "posters" e mesas redondas, a cargo de pesquisadores norte-americanos, canadenses, alemães, franceses, mexicanos, japoneses e brasileiros. O campo microbiológico foi coberto por 2 (Pesquisa Microbiológica Aplicada e Sistemas Inovativos de Bioconversão) das 5 grandes sessões plenárias, bem como nas comunicações em cartazes, totalizando aproximadamente metade dos trabalhos apresentados. A busca de novos microrganismos ligno (hemi)-celulolíticos, bem como o aprimoramento da habilidade fermentativa a solventes orgânicos, a partir dos açúcares obtidos de biomassa vegetal, foi preocupação dominante. Para o atendimento destes dois objetivos básicos, a investigação reposou em gêneros tais como *Thermonospora*, *Trichoderma*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Pachysolen* e *Candida*.

Em ótica, subjetivamente determinada, são alguns trabalhos dignos de menção:

- a) Utilização de fragmentos de DNA cromosomal de *Candida* como vetores de clonagem em hetero-aceptores (*S. cerevisiae* e *E. coli*) bem como para replicação autônoma no próprio doador.
- b) A mutagenização (UV) de *Streptomyces* degradador de lignina, seguida de fusão protoplástica intraespecífica para a produção otimizada de derivados hidrossolúveis de lignina, úteis como antioxidantes/surfactantes e componentes de adesivos/resinas.
- c) Seleção de mutantes de *Pachysolen*, incapazes de crescimento (catabolização) em etanol e, portanto, hiperprodutoras deste solvente, a partir de pentoses.
- d) Obtenção de mutante auto-agregante permanente, de *S. uvarum*, com habilidades osmo/etanol-tolerantes, utilizáveis na fermentação de xarope a 40% de sacarose.
- e) A fermentação de madeira até 2,3-butanodiol em cultura mista com *T. hazianum* e *K. pneumoniae*.
- f) A modulação do processo secretório de proteínas (até 9% do total celular), por *Saccharomyces* através da aeração e concentração salina do meio.
- g) O incremento do rendimento butanolíco, na fermentação de açúcares com *C. aceto-butylicum*, mediante a aplicação de uma atmosfera de CO₂, inibitória para a etapa enzimática que leva a acetona, co-produto fermentativo.
- h) Seleção de mutantes de *Ch. reinhardtii*, com níveis alterados de carboxilase e clorofila, para otimização da fotoprodução de hidrogênio.
- i) Co-cultura de bactérias marinhas metanogênicas, utilizando a biomassa da alga azul-esverdeada *Dermocarpa* sp., para a produção de metano (65% de bioconversão).
- j) Isolamento e caracterização bioquímica da glucoamilase de *S. diastasicus*, capaz de hidrolizar amido e maltoligossacarídis.

As contribuições nacionais ao 6º Simpósio em Biotecnologia de Combustíveis e Produtos Químicos foram do Instituto de Química da UFRJ ("Imobilização de glucoamilase em quitina e outros suportes baratos") e do Departamento de Bioquímica da UFPR ("Hidrólise fosfórica de hemiceluloses de bagaços de cana e sorgo: Fermentação com *Pachysolen* e *Fusarium*").

José Domingos Fontana
Deptº de Bioquímica UFPR
Caixa Postal 19046
80000 Curitiba PR

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 iniciou 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.

APRESENTAÇÃO DOS NOVOS CONCEITOS DE BIODIGESTORES PARA DIMINUIÇÃO DO TEMPO DE RETENÇÃO HIDRÁULICA

Manuel Romero de La Iglesia

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo - IPT
Caixa Postal 7141
01000 São Paulo SP, Brasil

Introdução

Nos últimos anos tem aumentado a preocupação com a proteção do meio ambiente onde vivemos, bem como a importância com a conservação das fontes de energia não renováveis.

Essa mudança de mentalidade tem feito com que os resíduos orgânicos, que podem ser de natureza industrial, rural ou urbana, passassem a ser considerados como materiais que necessitam de algum tratamento antes de serem descartados e que podem gerar alguma forma de energia. Com esse intuito, diversos processos podem ser empregados para simples tratamento ou para aproveitamento desses resíduos.

Dentre esses processos, a digestão anaeróbia apresenta-se tecnicamente atraente, pois reduz o potencial poluidor através da redução da matéria orgânica e da carga de microrganismos patogênicos (processo de tratamento) além de gerar uma fonte de energia renovável (processo de aproveitamento) na forma de biogás.

Historicamente, a digestão anaeróbia tem sido um processo pouco aplicado devido, principalmente, a dois fatores: tamanho e custo das instalações e o baixo valor comercial do biogás. Estes dois aspectos vêm sofrendo uma modificação radical nos últimos tempos: o primeiro, pela concepção de novos tipos de digestores mais eficientes e o segundo, pela majoração do preço do petróleo e das outras formas de energia.

Digestão anaeróbia: o processo, limitações, progressos e alternativas de melhoramento

A digestão anaeróbia é basicamente, uma fermentação bacteriana que ocorre em ambientes isentos de oxigênio livre.

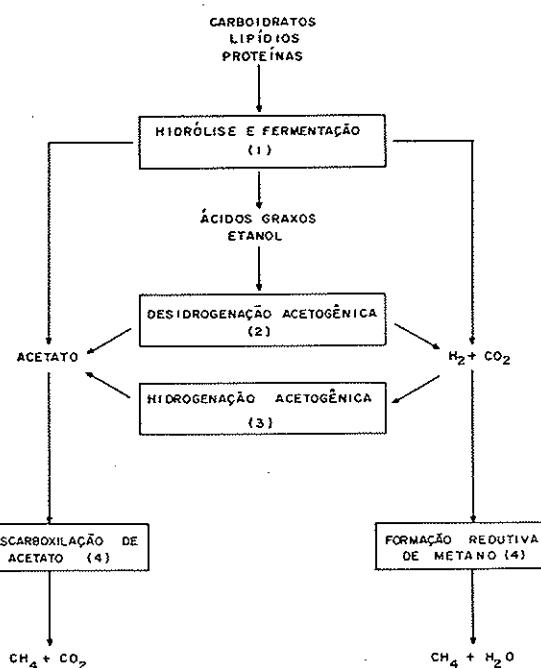
Esse processo pode ser apresentado como ocorrendo em quatro etapas, como mostrado na Figura 1, e pode utilizar como substrato estercos de animais, restos vegetais, lodos de esgoto, resíduos agro-industriais, etc.

Figura 1 - Esquema de 4 estágios para a degradação anaeróbia completa pelos quatro grupos principais de microrganismos da digestão anaeróbia.

Símbolos: 1 = Bactérias fermentativas; 2 = Bactérias acetogênicas produtoras de hidrogênio; 3 = Bactérias homoacetogênicas; 4 = Bactérias metanogênicas (2)

Tabela 1 - Resultados de Jewell (6) em digestores de esterco bovino misturado com palha

Parâmetro	Valores
Volume do reator (l)	4,5 4,5
Concentração de sólidos totais (%)	25 25
Tempo de retenção de sólidos (dia)	20 10
Temperatura (°C)	35 35
Fator de conversão (l gás/l reator x dia)	1,60 0,96



A aplicação do processo de digestão anaeróbia como forma de tratamento sempre foi limitada, tanto para resíduos sólidos quanto para resíduos líquidos, pela necessidade de grandes tempos de retenção hidráulica (TRH), normalmente superiores a 20 dias, o que implicava em equipamentos de grandes dimensões. A isso se somam os baixos custos de energia dispendida quando se optava por outros sistemas de tratamento, principalmente aeróbios e o baixo valor comercial do biogás produzido na digestão anaeróbia.

Essa situação se modificou radicalmente quanto aos dois últimos aspectos citados, a partir da elevação considerável do preço do petróleo e da energia de forma geral, assim como pela compreensão de que os combustíveis fósseis são finitos.

A partir da realidade exposta acima, o processo de digestão anaeróbia passou a ser visto com outros olhos, à medida que passaram a surgir inovações tecnológicas para melhorá-lo.

Partindo-se de um reator otimizado no que se refere a alguns parâmetros, tais como temperatura, nutrientes, agitação e nível de inibidores, duas alternativas desportam para aumentar a eficiência da digestão anaeróbia: uma a nível microbiológico e outra, a nível de projeto.

Em relação ao primeiro aspecto, convém ressaltar que a digestão anaeróbia é executada por uma variada flora microbiana, sendo possível influenciar o processo, atuando na população responsável pelo mesmo, através, por exemplo, da obtenção de inóculos concentrados ou ainda, selecionado e introduzindo no reator bactérias capazes de fermentar mais rápido e se multiplicar com maior velocidade, resistir a inibidores mais comuns ao processo de digestão e finalmente, que sejam mais eficientes em termos de m³ de gás produzido/kg DQO (Demanda Química de Oxigênio) adicionada.

Em relação ao segundo aspecto, a nível de projeto, podem-se introduzir modificações no reator, de modo a conseguir operar com menores TRH, resultando com isso em reatores de menor porte, e aplicar cargas orgânicas (kg DQO/m³ de volume de reator x dia) mais elevadas, aumentando-se com isso a produtividade de gás do processo (m³ de gás produzido/m³ de volume de reator x dia).

Tabela 2 - Resultados de Jewel (6) em fermentações com baixo teor de sólidos totais

Parâmetro	Valores
Volume do reator	(m³) 4,5 4,5
Concentração de sólidos totais	(%) 5,0 5,0
Tempo de retenção hidráulica	(dia) 20,0 10,0
Temperatura	(°C) 35,0 35,0
Fator de conversão	(l gás/l reator x dia) 0,66 0,86

Tabela 3 - Resultados obtidos por Schroepfer (13) em digestor anaeróbio de contato.

Símbolos: * = Lodo retornado/material alimentado

Parâmetro	Valor
Volume do reator	(m³) 22
Tempo de retenção hidráulica	(h) 12
Temperatura	(°C) 35
Razão de reciclo*	2,75
Concentração de sólidos voláteis no efluente	(ppm) 1,50
Carga orgânica	(KgSV/m³/dia) 2,90
Remoção de sólidos voláteis (%)	83

Neste trabalho procura-se concretizar os novos conceitos de biodigestores em desenvolvimento ou já sendo aplicados industrialmente, capazes de operar com elevadas cargas e/ou baixos TRH.

Tabela 4 - Resultados do IPT (2) e de Pette (9) na operação de digestores de fluxo ascendente em escala piloto.

Símbolos: * = Tempo de retenção mínimo; ** = Taxa de aplicação máxima

Parâmetro	IPT	Pette
Volume do reator	(m³) 11	30
Tempo de retenção hidráulica	1,5 dia*	9h
Temperatura	(°C) 30	30
Concentração de DQO no afluente	(Kg/m³) 30	3,5
Taxa de aplicação	(kgDQO/m³ x dia) 18,7	11,0
Produtividade em gás	(m³ gás/m³ x dia)	7,0 4,5
Remoção de DQO (%)	80	93

Resíduos com alto teor de sólidos suspensos (maior que 10%)

Os digestores de lodo de esgoto são alimentados geralmente, com uma concentração total de sólidos da ordem de 5%. Entretanto, a maior parte dos resíduos agrícolas e urbanos apresenta uma concentração de sólidos maior que 10%.

A fermentação destes últimos resíduos em digestores convencionais obriga a que se dilua o resíduo para abaixar a concentração total de sólidos, aumentando, desse modo, o volume de material a ser tratado.

A diluição não é um pré-requisito para o processo de digestão anaeróbia. Com base nisso, estão sendo desenvolvidas novas tecnologias de reatores que permitem a fermentação direta de resíduos com alta concentração de sólidos totais. Podemos lembrar que os aterros sanitários energéticos, por exemplo, produzem biogás a partir de lixo urbano com cerca de 50% de sólidos totais.

O processo de digestão anaeróbia de resíduos com alta concentração de sólidos (maior que 10%) é conhecido como "fermentação anaeróbia a seco".

As principais vantagens da fermentação a seco são: economia de água para diluição, menores consumos de energia para manter a temperatura do biodigestor, dispensa de bomba e sistema de agitação e produção de um efluente mais seco, o que facilita o seu manuseio para disposição final.

A fermentação a seco tem sido estudada por vários pesquisadores, de diferentes países, nas últimas décadas.

Para efeito de ilustração, a Tabela 1 apresenta alguns resultados obtidos por Jewell (6), em laboratório, na digestão de esterco bovino misturado com palha, trabalhando em reator convencional sem agitação.

Para efeito de comparação mostramos na Tabela 2, alguns resultados obtidos pelo mesmo autor, referentes a reatores com baixa concentração de sólidos totais.

A carga e descarga do biodigestor que opera com fermentação a seco e o controle de temperatura são alguns problemas tecnológicos que devem ser resolvidos, para que esses sistemas sejam viáveis, principalmente em grandes digestores.

Resíduos líquidos

Como já citado anteriormente, uma das restrições que inviabilizam economicamente a aplicação do processo de digestão anaeróbia para resíduos líquidos era a necessidade de grandes TRH, geralmente superiores a 20 dias, o que trazia como consequência a necessidade de equipamentos de grandes dimensões.

Atualmente, essa restrição está sendo superada, na medida em que se vem desenvolvendo digestores nos quais se pode tornar independente o TRH do tempo de retenção celular, diminuindo o primeiro e mantendo o segundo em valores elevados.

Digestores de fluxo ascendente com leitos de lodo, filtros anaeróbios, digestores anaeróbios de contato e digestores com leito fluidizado são sistemas capazes de operar com TRH inferiores a 24h, o que pode ser muito baixo.

Esses reatores operam com pequenos TRH desde que se obtenha uma população elevada de bactérias responsável pelo processo.

A obtenção de uma população bacteriana elevada pode ser conseguida de duas maneiras: retendo as bactérias dentro do digestor, como ocorre no digestor de fluxo ascendente com leito de lodo, no filtro anaeróbio e no filtro fluidizado, ou retornando-as, como no digestor anaeróbio de contato. Tais procedimentos asseguram uma perda muito pequena de bactéria e portanto, mantém o tempo de retenção celular praticamente infinito.

A Figura 2 apresenta uma representação esquemática dos digestores acima citados.

Esses tipos de digestores, uma vez atingida a população máxima e estando a mesma em boas condições de atividade metabólica, serão capazes de receber e converter uma quantidade elevada de matéria orgânica, representada por exemplo, pela taxa de aplicação de DQO (kg de DQO adicionados a cada m³ de reator por dia).

Assim, enquanto para digestores tradicionais não é possível reduzir o TRH a valores inferiores a cerca de 10 dias, para operação na faixa mesofílica, com os digestores de alta eficiência apresentados, é possível, dependendo da DQO da água residual a ser tratada, operar-se com valores de TRH de algumas horas (8) ou mesmo de fração de hora (5, 11).

Reator aeróbio de contato - Esse sistema foi o primeiro orientado no sentido de tornar independentes o tempo de retenção das bactérias e o tempo de retenção hidráulica. O sistema prevê o emprego de um decantador externo, fazendo retornar ao reator o lodo bacteriano retido no decantador, a partir do efluente do processo.

O reator anaeróbio de contato apresenta alguns inconvenientes, tais como, consumo de energia com a recirculação do lodo, com possibilidade de alguma aeração do lodo no decantador e dificuldade para decantação devido à liberação de gás residual no decantador.

A Tabela 3 resume alguns resultados obtidos em escala piloto por Shroepfer & col. (13), trabalhando com esse sistema de digestor, com resíduo de matadouro.

Reator de fluxo ascendente com leito de lodo - Este tipo de reator é provido em sua parte superior de um decantador, que tem como função reter os aglomerados de lodo,

Tabela 5 – Resultados de Riera (11) e Frostell (3) em reator tipo filtro anaeróbio em escala de laboratório

Parâmetro	Riera	Frostell
Volume de vazios do reator	(L)	0,25
Resíduo	vinhaça	meio sint.
Tempo de retenção hidráulica	(h)	8
Temperatura	(°C)	40
Concentração de DQO no influente	(Kg/m ³)	10
Taxa de aplicação	(KgDQO/m ³ xdia)	30
Produtividade em gás	(m ³ gás/m ³ xdia)	7,5
Remoção de DQO	(%)	66
		80

Tabela 6 – Resultados de Jewell (5) em reator de leito fluidizado em escala de laboratório

Parâmetro	Valor	
Volume de vazios do reator	(L)	1,0
Tempo de retenção hidráulica	(min)	60
Temperatura	(°C)	20
Concentração de DQO no influente	(Kg/m ³)	0,25–0,30
Taxa de aplicação	(KgDQO/m ³ /dia)	4,0
Remoção de DQO	(%)	75

(partículas de alguns milímetros de diâmetro) chamados grãos ou "pellets", não deixando que saiam com o efluente e possibilitando a formação de três regiões distintas no interior do digestor, com comportamentos dinâmicos característicos e inter-relacionados. No fundo do reator forma-se um leito biológico constituído de material granulado, o qual é sobreposto por uma região constituída de material biológico em menor grau de concentração e aglomeração em relação ao leito inferior. A região superior de decantação tem características tais que permitem a aglomeração do lodo que venha a atingir esta região, com o consequente retorno à zona ativa do reator. É um reator recomendado para resíduos com baixo teor de sólidos suspensos (em torno de 1%).

A Tabela 4 apresenta alguns resultados obtidos pelo IPT (2) na operação de um digestor de fluxo ascendente de 11m^3 de volume, para tratamento de vinhaça de caldo de cana, durante a safra 81/82 e alguns resultados de Pette & col. (9) com reator de 30m^3 , operando com resíduo da fabricação de açúcar.

Reator tipo filtro anaeróbico - Esse tipo de reator possui um enchimento que pode ser constituído, entre outros, de anéis de Pall ou Rasching, pedra britada e recheios plásticos com diversas conformações. Tais reatores baseiam-se na tendência das bactérias em aderir a superfícies sólidas. A quantidade de microrganismos retidos é função da relação superfície/volume sendo portanto, determinada pela área do enchimento. A esse fenômeno superficial soma-se o efeito de retenção do lodo biológico nos interstícios entre os elementos que compõem o enchimento. O contato entre o filme ativo e o substrato se dá durante o escoamento ascendente do fluido através do recheio.

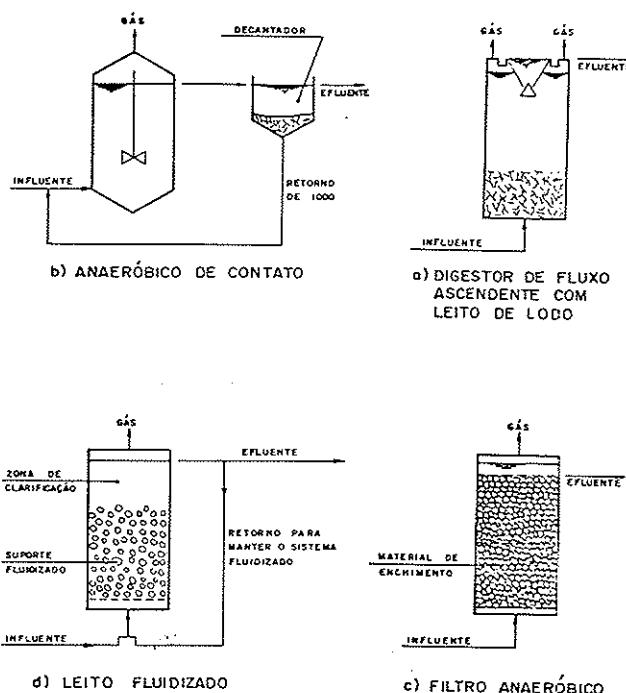
O reator em questão é mais adequado para resíduos contendo baixo teor de sólidos em suspensão, evitando-se assim a obstrução dos interstícios do recheio.

A Tabela 5 mostra o resumo de alguns resultados obtidos por Riera & col. (11) trabalhando com vinhaça de melaço diluída e por Frostell (3), com um meio sintético facilmente degradável à base de amido solúvel, nitrogênio e fósforo.

Reator com leito fluidizado - O princípio básico de funcionamento deste reator é a adesão das bactérias a superfícies sólidas, conforme já citado no reator tipo filtro anaeróbico, sendo constituído de um recheio particulado através do qual o resíduo líquido escoa em movimento ascendente.

Este reator difere do tipo anterior em relação ao suporte de ataque das bactérias, que no presente caso permanece em suspensão devido a uma vazão de reciclo do efluente, vazão esta que é responsável pela fluidização do leito particulado.

Figura 2 - Representação esquemática de digestores de alta eficiência



Os problemas de obstrução que poderiam ocorrer no suporte fixo devido à presença de sólidos suspensos no influente, são evitados com este tipo de reator.

Como inconveniente na aplicação do reator de leito fluidizado, pode-se apontar a vazão de reciclo e o consumo de energia necessário à manutenção do suporte em expansão.

A Tabela 6 apresenta um resumo de alguns resultados obtidos por Jewell & col. (5) com esse tipo de reator, usando como resíduo o sobrenadante de esgoto doméstico.

Outras alternativas para otimização do processo

Processo em duas fases separadas - No processo de digestão anaeróbia atuam dois grupos principais de bactérias: as produtoras de ácidos e as formadoras de metano, que diferem com respeito à fisiologia, necessidades nutritivas e taxa de crescimento.

Diante disso surge uma possibilidade de otimização das etapas do processo, executando-as, por exemplo, em dois reatores diferentes, o que permitiria operá-los com tempo de retenção hidráulica, temperatura, carga orgânica e pH ótimos para cada grupo de bactérias.

Esse processo é conhecido como processo em duas fases (4, 10).

Imobilização de bactérias - Imobilização é um processo físico pelo qual as células são confinadas ou ligadas num suporte material, mantendo suas características próprias e podendo ser usadas repetida e continuamente.

A literatura reporta alguns trabalhos realizados, um na Alemanha (12), com imobilização de uma bactéria selecionada do lodo de esgoto e outro no Japão (7), onde se imobilizou uma população de bactérias selecionadas a partir do lodo de esgoto. Em ambos os trabalhos a imobilização foi feita em ágar-ágár.

A imobilização pode permitir que especialmente os substratos solúveis sejam tratados com grande eficiência em reatores nos quais grande número de bactérias foram imobilizadas, obtendo elevada concentração de bactérias no interior do biodigestor.

Referências Bibliográficas

1. Barbosa, R.A. - Novas tecnologias em biodigestores. In: - V Simpósio Nacional de Fermentação, Viçosa MG, 26 a 29 de Julho de 1982.
2. Craveiro, A.M. - Produção de biogás a partir de vinhaça. In: - V Simpósio Nacional de Fermentação, Viçosa MG, 26 a 29 de Julho de 1982.
3. Frostell, B. - Anaerobic treatment in a sludge bed system compared with a filter system. Journal Water Pollution Control Federation, 53:216-222, 1981.
4. Gosh, S. & Klass, D.L - Two-phase anaerobic digestion. In: - Symposium on clean fuels from biomass and wastes. Orlando, Fla., 25-28 January, 1977, Chicago, Il., Institute of Gas Technology, 373:415, 1977.
5. Jewell, W.J.; Switzenbaum, M.S. & Morris, J.W. - Municipal wastewater treatment with the anaerobic attached microbial film expanded bed process. Journal Water Pollution Control Federation, 53:482-490, 1981.
6. Jewell, W.J. & Wujck, W.J. - Dry anaerobic fermentation. In: - Second Symposium on Biotechnology in Energy Production and Conservation, Gatlinburg, Ten., 3 to 5 October, 1979.
7. Karube, I.; Kuriyama, S.; Matsunaga, T. & Suzuki, S. - Methane production from wastewaters by immobilized methanogenic bacteria. Biotechnology and Bioengineering, 22:847-857, 1980.
8. Lettinga, G. & col. - Use of upflow sludge blanket (USB) reactor concept for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. Biotechnology and Bioengineering, 22:699-734, 1980.
9. Pette, K.C.; Vletter, R.; Wind, E. & Van Gils, W. - Fullscale anaerobic treatment of beet-sugar wastewater. The Netherlands, CSM Suiker b.v.
10. Pohland, F.G. & Ghosh, S. - Developments in anaerobic stabilization of organic wastes: the two-phase concept. Environ. Letters, 1:255-266, 1971.

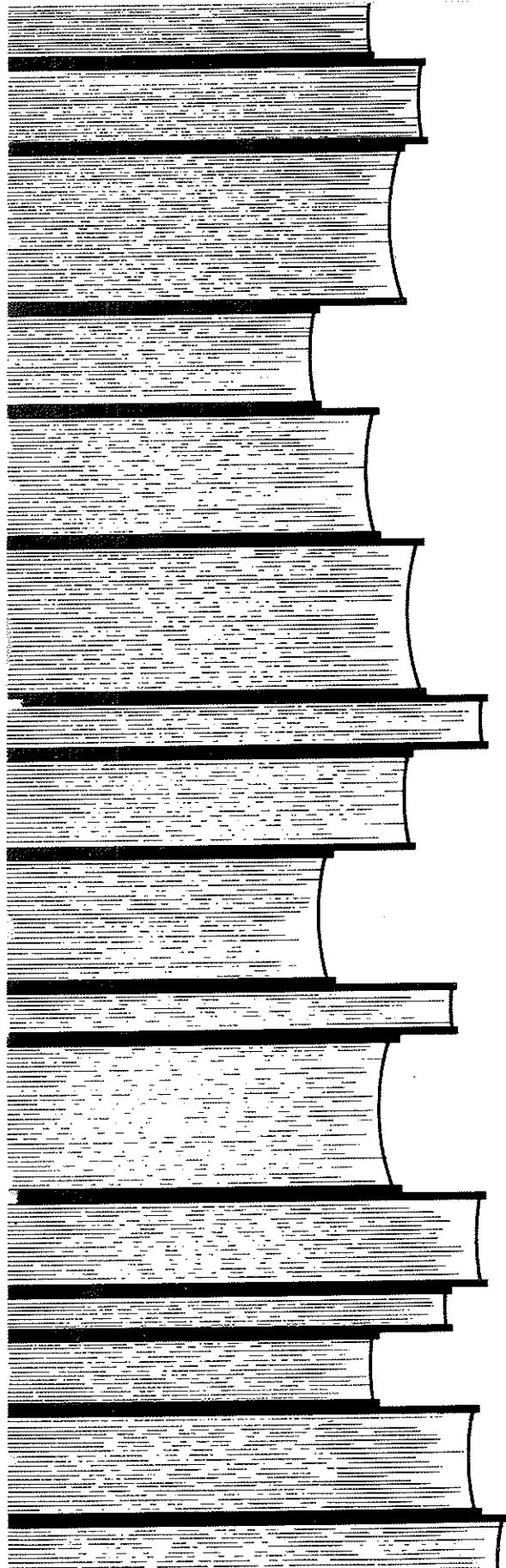
11. Riera, F.S.; Valz-Gianinet, S.; Callieri, D. & Siñeriz, F. - Use of packed-bed reactor for anaerobic treatment of stillage of sugar-cane molasses. *Biotechnology Letters*, 4:127-132, 1982.
12. Scherer, P.; Kluge, M.; Klein, J. & Sahm, H. - Immobilization on the methanogenic bacterium *Methanosarcina barkeri*. *Biotechnology and Bioengineering*, 23:1057-1065, 1981.
13. Schropfer, G.J. & col. - The anaerobic contact process as applied to packinghouse wastes. *Sewage and Industrial Wastes*, 27:460-485, 1955.
14. Souza, M.E. - Fatores que afetam a digestão anaeróbia. In: - V Simpósio Nacional de Fermentação, Viçosa MG, 26 a 29 de Julho de 1982.

Fotolitos e Impressão



Avenida Boaert, 64
Vila das Moças - São Paulo
Fone: 914-0233
CEP 04290





**Através do
COMUT
você passa
a ter acesso
ao acervo
de
periódicos
das
principais
bibliotecas
do País.**

Informe-se sobre nosso
SISTEMA DE INTERCÂMBIO BIBLIOGRÁFICO

junto à Secretaria Executiva do COMUT:
Ministério da Educação e Cultura — Anexo I — 4º andar
Caixa Postal 07/1127 — CEP 70000 — Brasília — DF
Tel.: 226-4575 R. 805/806
Telex: (061) 2018 COPN

COMUT PROGRAMA
DE COMUTAÇÃO
BIBLIOGRÁFICA

