

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 16 Número 4 Out.-Dez. 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 genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviaturas bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($m\mu$) micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6} m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9} m$), ao invés de milímicro ($m\mu$); e Angstroms (\AA ; $10^{-10} m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

A página título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação.

O resumo não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada da restante do texto.

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas devem ser feitas em papel brillante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

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

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



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Conselho Diretor	Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo
Diretor Executivo	João Salvador Furtado Instituto de 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 Walderez Gambale Instituto de Ciências Biomédicas USP Deptº 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
Depto. de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.icb.usp.br

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 16 OUTUBRO-DEZEMBRO 1985 NÚMERO 4.
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 16(4)

CONTÉUDO

- | | | |
|--|---|---|
| Frigo, S.M.
& Azevedo, J.L. de | 255 Influência de plasmídio R
na frequência de mutação
em <i>Escherichia coli</i> | Influence of an R plasmid
in the mutation frequency
in <i>Escherichia coli</i> |
| Asensi, M.D.
& Hofer, E. | 260 Pesquisa de <i>Yersinia</i>
<i>enterocolitica</i> em
pacientes reumáticos. I -
Bacteriologia | Investigation of <i>Yersinia</i>
<i>enterocolitica</i> in
rheumatic human patients.
I - Bacteriology |
| Rossi Jr., O.D.;
Nader Fº, A.
& Amaral, L.A. do | 269 Estudo comparativo entre
os testes de coagulase e
termomonuclease na
identificação do
<i>Staphylococcus aureus</i> | Comparative study between
the coagulase and
thermonuclease tests in
the identification of <i>S.</i>
<i>aureus</i> |
| Fonseca, L. de S.;
Silva, M.G. da
& Gontijo Fº, P.P. | 272 Avaliação da eficiência
do meio 7H10 com soro
fetal bovino no
crescimento de
micobactérias do complexo
<i>M. tuberculosis</i> | Evaluation of the
effectiveness of the 7H10
medium containing fetal
bovine serum and dextrose
on supporting the growth
of the <i>M. tuberculosis</i>
complex strains |
| Barbosa, S.F.C.;
Adelino, M.G.F.;
Takeda, A.K.
& Umekita, I.F. | 275 Pesquisa de
imunocomplexos
circulantes em pacientes
com meningococcemia | Research of circulating
immune complex in
patients with
meningococcemia |
| Almeida, A.M.P. de;
Brasil, D.P.;
Melo, M.E.B. de;
Nakazawa, M.
& Almeida, C.R. de | 280 Demonstração de atividade
pestosa no foco da Serra
dos Órgãos (Rio de
Janeiro, Brasil) no
período de 1983 a 1984,
através de exames
sorológicos em roedores | Detection of plague
activity in the focus of
the "Serra dos Órgãos"
(Rio de Janeiro, Brasil)
by serological
examination of rodents
during the period from
1983 to 1984 |
| Ricci, L.C.;
Marton, R.C.A.N.
& Castro, A.F.P. de | 282 Produção de hemolisina
por amostras de
<i>Escherichia coli</i>
enterotoxigênicas de
origem suína e sua
influência nas reações de
imunohemólise para a
detecção da enterotoxina
termo-lábil (LT) | Haemolysin production by
enterotoxigenic
<i>Escherichia coli</i> of
porcine origin and its
influence in hemolytic
tests for thermolabile
(LT) enterotoxin
detection |
| Gruber, A.;
Mós, E.N.;
Durigon, E.L.
& Noronha, A.M.B. | 287 Prevalência de
<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C.</i>
<i>coli</i> em fezes normais e
diarréicas de cães em São
Paulo | Prevalence of
<i>Campylobacter jejuni</i> and
<i>C. coli</i> in normal and
diarrhoeic faeces from
dogs in São Paulo |

CONTENTS

Passos, F.M.L. & Passos, F.J.V.	290	Descrição e classificação de bactérias acéticas isoladas da fermentação do cacau, com base em uma análise numérica	Description and classification of acetic bacteria isolated from cacao fermentation based on the numerical analysis
Rosalem, P.L.; Tauk, S.M. & Santos, M.C.N. dos	299	Efeito da temperatura, pH, tempo de cultivo e nutrientes no crescimento de fungos imperfeitos em vinhaça	Effect of temperature, pH, time of cultivation and nutrients on the production of fungi imperfecti in distillery slops (vinasse)
Sant'Anna, E.S. & Aquarone, E.	305	Crescimento de <i>Candida utilis</i> em licor sulfítico (licor negro): experimento em fermentador	
Magaldi, C. & Montelli, A.C.	309	Curso de mecanismos de agressão e defesa	Course on Mechanisms of aggression and defense
Suassuna, I.	316	Testes de sensibilidade bacteriana aos antibióticos: o antibiograma	
Informação Técnico-Científica SBM	323		

INFLUÊNCIA DE PLASMÍDIO R NA FREQUÊNCIA DE MUTAÇÃO EM ESCHERICHIA COLI

Silvia Maria Frigo
& João Lucio de Azevedo

Instituto de Genética Esalq
Caixa Postal 83
13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Comparando-se a frequência de reversão espontânea de auxotrofia para prototrofia entre duas linhagens isogênicas de *E. coli*, uma portadora, e outra não portadora de plasmídio R, verificou-se a influência do plasmídio na frequência de mutações e na emergência de mutantes resistentes à estreptomicina. Na linhagem portadora do plasmídio houve aumento na frequência de reversão espontânea para metionina da ordem de 1,29 a 54,33 vezes e de 2,22 a 11,56 para prolina. A presença do plasmídio aumentou o número de mutações para a resistência à estreptomicina de 99,03 a 343,4 vezes.

Summary

Influence of an R plasmid in the mutation frequency in Escherichia coli

Comparing the frequency of spontaneous reversion from auxotrophic to prototrophic mutants between two isogenic strains one bearing a R plasmid and a second without plasmid it was found the influence of a plasmid in the mutation frequency and in the emergence of streptomycin resistant mutants. In the plasmid-bearing strain it was found an increase in the spontaneous reversion frequency in a range from 1.29 to 54.33 times for metionine and from 2.22 to 11.56 for proline. The plasmid presence increased the number of mutations to streptomycin resistance from 99.03 to 343.4 times.

Introdução

Dentre os microrganismos, em especial as bactérias, inúmeros casos de instabilidade correlacionada com genes mutadores têm sido relatados (2, 4, 7, 25). Além da presença de genes mutadores, também já foram descritos casos de instabilidade relacionados à reversão de marcas auxotróficas (5, 11). Por outro lado, sabe-se que, em bactérias, elementos genéticos extracromossómicos conferem resistência a várias substâncias antimicrobianas, incluindo antibióticos, quimioterápicos e sais de metais pesados (22, 24). Um fato que merece atenção especial, devido às implicações clínicas e biológicas que acarreta, é de que certos plasmídios R ou colicinogênicos reduzem a susceptibilidade de seus hospedeiros aos efeitos letais da irradiação ultravioleta, aumentando, porém, o efeito mutagênico da mesma, com respeito à reversão de certas mutações causadoras de caráter auxotrófico (6, 9, 10, 13, 14, 15, 16). Além disso, foi observado que plasmídios R (18, 19) aumentam também a frequê-

cia de reversão espontânea, como é o caso do mutante his de *Salmonella typhimurium* (8, 17, 19, 20).

O presente trabalho foi então conduzido com a finalidade de se estudar a influência de um plasmídio de *Escherichia coli* que causa resistência a várias drogas, em relação à reversão de duas marcas auxotróficas. Também a influência desse plasmídio foi estudada em relação à frequência de mutação para resistência à estreptomicina.

Material e Métodos

Linhagens - (a) *Escherichia coli* J₅^{Nx} mutante auxotrófico deficiente em prolina e metionina e resistente ao ácido nalidíxico (Nx), obtida em nosso laboratório; (b) *Escherichia coli* 99, prototrófica e portadora do plasmídio R, que confere resistência ao cloranfenicol (Cm); canamicina (Km); tetraciclina (Tc) e bicloreto de mercúrio (Hg), obtida por Chartone-Souza (3). Esta linhagem originalmente era também resistente à hetacilina (He), mas como verificado no presente trabalho, mostrou-se suscetível à droga, possivelmente por perda do plasmídio que carrega essa marca (21).

Meios de cultura - Foram utilizados o nutriente ágar (Difco), o nutriente líquido (Difco) e o meio mínimo sólido para *E. coli* (1).

Drogas antimicrobianas - Ácido nalidíxico (Winthrop Products Inc.), bicloreto de mercúrio (E. Merck), sulfato de canamicina e hetacilina (Laboratória Bristol S.A.), cloranfenicol (Parke-Davis Ltda.), sulfato de estreptomicina (Fontoura-Wyeth Indústrias Farmacêuticas S.A.), tetraciclina (Pfizer Inc.).

Transferência do plasmídio R por conjugação - Para a transferência das marcas de resistência da linhagem doadora (*E. coli* 99) para a linhagem receptora (*E. coli* J₅^{Nx}), foi utilizado o processo da conjugação (12).

Comparação da frequência de reversão de auxotrofia para prototrofia entre linhagem portadora e não portadora de plasmídio - A frequência de reversão foi calculada pela contagem do número de colônias das linhagens semeadas em placas contendo MM + prolina (reversão para metionina) e MM + metionina (reversão para prolina).

A semeadura com diluições apropriadas das mesmas linhagens em MM + prolina + metionina e posterior contagem de colônias permitiu o cálculo do número de bactérias utilizadas (título). A contagem das colônias foi feita após a incubação por 3 a 4 dias a 37°C.

Tabela 1 - Transferência de marcas de resistência da linhagem *E. coli* 99 para *E. coli* J₅^{Nx}

Linhagens	Níveis de resistência (μg/ml)					
	Rm	C1	Tc	Hg	He	Nx
<i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx}	1	1	5	10	10	50
<i>E. coli</i> 99	200	200	200	50	10	1
<i>E. coli</i> J ₅ ^{Nx} 99	200	200	200	20	10	20

Tabela 2 - Frequência de reversão da deficiência em prolina e metionina nas linhagens *E. coli* J₅^{Nx} e *E. coli* J₅^{Nx} 99

Exp.Nº	Linhagens	Títulos	Reversões x 10 ⁸ células	
			Metionina	Prolina
1	J ₅ ^{Nx}	1,49 x 10 ⁹	9,58	9,12
	J ₅ ^{Nx} 99	2,15 x 10 ⁹	77,20	54,88
2	J ₅ ^{Nx}	4,92 x 10 ⁸	10,77	20,73
	J ₅ ^{Nx} 99	2,52 x 10 ⁸	139,68	239,68
3	J ₅ ^{Nx}	2,05 x 10 ⁸	1,02	3,34
	J ₅ ^{Nx} 99	3,10 x 10 ⁸	5,23	2,63
4	J ₅ ^{Nx}	9,00 x 10 ⁸	0,51	0,66
	J ₅ ^{Nx} 99	2,70 x 10 ⁸	0,66	1,47
5	J ₅ ^{Nx}	1,49 x 10 ⁹	0,06	0,33
	J ₅ ^{Nx} 99	2,15 x 10 ⁹	3,26	3,26

Tabela 3 - Frequência de mutação para resistência a estreptomicina em linhagens portadora e não portadora de plasmídeo em *E. coli*

Exp.Nº	Linhagens	Títulos	Mutações (10 ¹¹ células)	Aumento (vezes)
1	J ₅ ^{Nx}	0,96 x 10 ¹⁰	1,04	
	J ₅ ^{Nx} 99	3,37 x 10 ¹⁰	103,00	99,03
2	J ₅ ^{Nx}	2,36 x 10 ¹⁰	0,06	
	J ₅ ^{Nx} 99	1,58 x 10 ¹⁰	20,60	343,4
3	J ₅ ^{Nx}	1,15 x 10 ⁹	0,43	
	J ₅ ^{Nx} 99	1,66 x 10 ⁹	43,00	100,0

Determinação da frequência de mutação para resistência a estreptomicina entre linhagem portadora e não portadora de plasmídio - Para ambas as linhagens (*E. coli* J₅^{Nx} e *E. coli* J₅^{Nx} 99) foram preparadas séries de placas contendo nutriente ágar acrescido de estreptomicina na concentração de 20 µg/ml. Foi utilizada essa concentração, pois, as linhagens de *E. coli* utilizadas, mostraram-se sensíveis à mesma em experimento prévio. A leitura dos tratamentos foi feita após 2 a 3 dias de incubação das placas com estreptomicina e das placas controle (somente nutriente ágar), após 24 horas, a 37°C.

Resultados e Discussão

Transferência do plasmídio R da linhagem *E. coli* 99 para *E. coli* J₅^{Nx} - Através de conjugação bacteriana, transferiu-se o plasmídio R da linhagem *E. coli* 99 para a linhagem *E. coli* J₅^{Nx}. Após a transferência, comparando-se a resistência na linhagem original e na receptora, verificou-se (Tabela 1) que o nível de resistência ao bichloreto de mercúrio, assim como ao ácido nalidíxico, diminuiu. Portanto, tanto o gene plasmidial para resistência ao bichloreto de mercúrio como o gene cromossômico para resistência ao ácido nalidíxico sofreram alteração em sua expressão. Uma explicação possível, seria que o gene que confere resistência ao mercúrio sofreu ação modificadora de genes cromossômicos da linhagem e também o gene cromossômico para resistência ao ácido nalidíxico sofreu ação dos genes plasmidiais. Expressividade variável de um mesmo plasmídio em diferentes hospedeiros já foi relatada por outros autores (8, 21, 23). Também não foi detectada resistência à hetacilina previamente descrita na ordem de 1000 µg/ml (3). Isto deve ter ocorrido por prévia perda de outro plasmídio independente, que carrega esta marca (21).

Reversão de marcas auxotróficas - Verificou-se aumento no número de reversões espontâneas, na ordem de 1,29 a 54,33 para metionina e de 2,22 a 11,56 para prolina (Tabela 2). O aumento verificado tanto na reversão para metionina como para prolina, indica que a ação do plasmídio não é específica para um só locus. Esses dados concordam, portanto, com os de Mortelmans & Stocker (20), os quais consideram que o plasmídio R₄₆ possui um gene uvp, que aumenta a capacidade de reparo sujeito a erros (explicando o efeito protetor a/e aumento mutagênico da luz UV). Em contraste, outros genes na ausência do uvp seriam responsáveis pela elevada frequência de reversão espontânea (explicando a propriedade mutadora do plasmídio), do gene cromossômico his G₄₆.

Frequência de mutação para resistência à estreptomicina - Como se pode observar (Tabela 3), os resultados com relação à mutação para estreptomicina na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} e na linhagem *E. coli* J₅^{Nx} 99, foram bastante conclusivos, uma vez que o número de mutações na linhagem portadora do plasmídio foi cerca de 99,03 a 343,4 vezes maior que na linhagem isogênica sem plasmídio.

Além das implicações do ponto de vista genético, este resultado é também, por razões óbvias, extremamente importante do ponto de vista clínico. Entretanto, mais pesquisas são necessárias para se verificar se, o caso aqui descrito, é apenas uma

exceção ou pode ser ampliado a outros plasmídios, outras espécies de bactérias e outras drogas antimicrobianas.

Agradecimentos

Este trabalho é parte da dissertação de Mestrado apresentada pelo primeiro autor à Esalq/USP, feito durante a vigência de uma bolsa do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e contou com o apoio financeiro do Programa Integrado de Genética (CNPq/PIG).

Referências Bibliográficas

1. Azevedo, J.L. & Neder, R.N. - Manual de genética de bactérias. Piracicaba, Esalq/USP (Publicação Didática), 1963.
2. Bohme, H. - Genetic instability of an ultraviolet sensitive mutant of *Proteus mirabilis*. *Biochem. Biophys. Commun.*, 28:191-196, 1977.
3. Chartone-Souza, E. - Resistência a drogas e propriedades colicinogênica em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, ICB/UFGM, 1975. (Tese de Mestrado).
4. Cox, E.C. - Mutator gene studies in *Escherichia coli*: the mut gene. *Genetics (Suppl.)*, 73:67-80, 1973.
5. Darlington, O. - Instabilities in *Salmonella typhimurium*. *Heredity*, 18:1-20, 1966.
6. Drabble, W.T. & Stocker, B.A.D. - R (transmissible drug-resistance) factors in *Salmonella typhimurium*: pattern of transduction by phage P22 and ultraviolet protection effect. *J. Gen. Microbiol.*, 53:109-123, 1968.
7. Goldstein, A. & Smoot, J.S. - A strain of *Escherichia coli* with an unusually high rate of auxotrophic mutation. *J. Bacteriol.*, 70:588-595, 1965.
8. Grinsted, J.; Saunders, J.R.; Ingram, L.C.; Skyes, R.B. & Richmond, M.H. - Properties of an R factor which originated in *Pseudomonas aeruginosa* 182. *J. Bacteriol.*, 110:529-537, 1972.
9. Howarth, S. - Resistance to the bactericidal effect of ultraviolet radiation conferred on enterobacteria by the colicine factor col I. *J. Gen. Microbiol.*, 40:43-55, 1965.
10. Howarth, S. - Increase in frequency of ultraviolet-induced mutation brought about by the colicine factor, col I in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.*, 3:129-134, 1966.
11. Kingsman, A.J.; Smith, A.J. & Hulanicka, M.D. - Genetic instability of auxotrophs of *Salmonella typhimurium* requiring cysteine or methionine and resistant to inhibition by 1, 2, 4-triazole. *Genetics*, 89:419-437, 1978.
12. Lederberg, J. & Tatum, E.L. - Gene recombination in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 112:315-326, 1946.
13. Lehrbach, P.; Kung, A.H.C. & Lee, B.T.O. - Loss of ultraviolet light protection and enhanced ultraviolet light-induced mutability in *Pseudomonas aeruginosa* carrying mutant R plasmids. *J. Gen. Microbiol.*, 101:135-141, 1977.
14. MacPhee, D.G. - Effect of an R factor on resistance of *Salmonella typhimurium* to radiation and chemical treatment. *Mutation Res.*, 14:450-453, 1972.
15. MacPhee, D.G. - Effect of rec mutation of the U.V. protecting and mutation enhancing properties of the plasmid R-Utrecht in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.*, 19:357-359, 1973.
16. MacPhee, D.G. - Effect of an R factor and caffeine on ultraviolet mutability. *Mutation Res.*, 18:367-370, 1973.
17. Miyatake, T. - Mutator factor in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, 45:11-14, 1960.
18. Morteilmans, K.E. & Stocker, B.A.D. - Effects of an R factor on susceptibility to the bactericidal action of ultraviolet irradiation and on rates of ultraviolet-induced and spontaneous mutation in *S. typhimurium*. *Microbial Gen. Bull.*, 36:25-27, 1974.

19. Mortelmans, K.E. & Stocker, B.A.D. - Ultraviolet protection enhancement of U.V. mutagenesis, and mutator effect of plasmid R₄₆ in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 128:271-282, 1976.
20. Mortelmans, K.E. & Stocker, B.A.D. - Segregation of the mutator property of plasmid R₄₆ from its ultraviolet-protecting property. *Mol. Gen. Genet.*, 167:317-327, 1979.
21. Oliveira, F.M. - Padrão de transmissão de marcadores de resistência a drogas em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, ICB/UFGM, 1980. (Dissertação de Mestrado).
22. Smith, D.H. - R factors mediate resistance to mercury, nickel and cobalt. *Science*, 156:114-116, 1967.
23. Smith, J.T. - R factor gene expression in gram-negative bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 55:109-120, 1969.
24. Smith, D.H. & Davis, B.D. - Mode of action of novobiocin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 193:71-79, 1967.
25. Treffers, H.P.; Spinelli, V. & Belser, D.D. - A factor (or mutator gene) influencing mutation rates. *Proc.Nat.Acad.Sci. U.S.A.*, 40:1064-1971, 1954.

PESQUISA DE YERSINIA ENTEROCOLITICA EM PACIENTES REUMATICOS. I - BACTERIOLOGIA*

Marise Dutra Asensi
& Ernesto Hofer

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

Resumo

Avaliou-se a ocorrência de portadores de *Yersinia enterocolitica*, através de coproculturas, em 157 pacientes com diferentes processos reumáticos e em 108 indivíduos sem manifestações reumáticas e/ou intestinais, caracterizados como controle. No cômputo geral, foram isoladas oito amostras, quatro oriundas do grupo reumático, pertencentes aos sorotípos 0:4, 0:5, 0:6 e 0:13 e número idêntico resultante do controle, caracterizadas como 0:5, auto-aglutinável e duas não aglutináveis, bioquimicamente identificadas como *Yersinia frederiksenii*. Considerações sobre a eficiência dos vários meios de enriquecimento e seletivos-indicadores empregados na pesquisa foram realizadas, assim como, a caracterização das amostras em biotipos e lisotipos.

Summary

Investigation of Yersinia enterocolitica in rheumatic human patients. I - Bacteriology

The occurrence of *Yersinia enterocolitica* was evaluated through feces' culture in 157 patients with different rheumatic processes and 108 people without rheumatic and/or intestinal manifestations used as control groups. Were isolated eight strains, four of them from the rheumatic group belonging to the serotypes 0:4, 0:5, 0:6 and 0:13 and four from the control group characterized as serotypes 0:5, being two of them not able to be agglutinated and based on biochemical tests identified as *Yersinia frederiksenii*. Considerations about the efficiency of the several media used in the investigation as enrichment, selective differential were taken, as well as, the characterization of the strains in biotypes and lysotypes.

Introdução

As repercussões clínicas da infecção por *Yersinia enterocolitica*, dependem de fatores inerentes à bactéria, tais como, os sorotípos e biotipos e das características intrínsecas ao hospedeiro, exemplificando-se, sexo e idade, além do nível de higidez imunológica.

* Parte da Tese de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz. Aprovada em dezembro de 1983.

A doença se manifesta principalmente por alterações gastrentéricas, caracterizadas por diarréia, apendicite ou ileite terminal, linfadenite mesentérica aguda, acompanhada ou não por febre, dores abdominais, vômitos e cefaléia (22, 35).

A partir da localização entérica, a doença pode evoluir até à septicemia, forma que se manifesta particularmente aos indivíduos susceptíveis ou imunodeficientes.

Além destas, existem manifestações outras que ocorrem em geral, após alguns dias de infecção, à semelhança de um fenômeno de hipersensibilidade, acometendo principalmente, adultos. Nestas estão incluídas as seguintes figuras clínicas: eritema nodoso (21, 43), artrite reumatóide (15), síndrome de Reiter (1, 33), poli-artrite crônica (19, 20), mono-artrite (32), inflamação da parede do miocárdio e pericárdio, com formas similares à da febre reumática (15, 18).

O objeto da presente investigação, se concentrou na pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos e não reumáticos, como uma tentativa de relacionar certas alterações reumatológicas com a presença deste microrganismo.

Material e Métodos

Origem e características dos pacientes - Foram utilizadas fezes de 157 pacientes, mencionados com a letra P, com manifestações reumáticas (grupo de reumáticos) e de 114 indivíduos, mencionados com a letra C que, clinicamente, não apresentavam sinais compatíveis com as alterações reumáticas e/ou gastrintestinais (grupo controle). O material foi obtido do Laboratório de Imunologia e Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HCUERJ) e do Laboratório Central de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas Gaffrée e Guinle (HCGG), Universidade do Rio de Janeiro (UNI-RIO). Os espécimes do grupo controle originaram-se apenas do HCUERJ.

Método de isolamento - O enriquecimento foi feito em três meios, distribuídos em tubos num volume de 10ml, a saber: meio de Rappaport modificado (MRB), segundo Wauters (42), incubado a 29°C, por 3 a 5 dias; salina tampão fosfato (PBS), pH 7,6, incubado a 4°C, com repiques no 7º, 14º, 30º, 60º e 90º dias; e Cold Mannitol Broth (CMB), segundo Christensen & Jansen (8), incubado a 4°C, com repiques no 7º, 14º, 30º e 60º dias.

O uso de meios seletivos, foi feito a partir da semeadura com as fezes "in natura", com o plaqueamento direto em: Ágar Salmonella-Shigella (SS Ágar) - Difco, com pH corrigido a 7,6; Ágar Desoxicolato-Citrato (DCA) - Merck; Ágar Sulfito de Bismuto (BSA) - Difco; e Ágar Tiosulfato-Citrato-Bile-Sacarose (TCBS) - Difco, com pH corrigido para 8,0 e acrescido de 10mcg% de Novobiocina, sendo utilizado somente para 48 espécimes do grupo reumático e 100 do grupo controle.

Todos os meios seletivos foram incubados a 29°C por 48 horas.

Identificação bioquímica e biotipificação - As amostras isoladas foram submetidas a 35 provas bioquímicas, adotando-se as fórmulas de meios, critérios de incubação e leitura das reações, segundo Kapperud, Bergan & Lassen (17), Costa & Hofer (9), Möller (24) e Wauters (41).

Identificação sorológica e lisotipia - Realizadas de acordo com as especificações técnicas apresentadas por Wauters (71). Nas amostras em que não foi possível caracterizar as estruturas antigênicas, assim como na etapa de identificação em lisotipos e biotipos, recorreu-se ao Centre National des Yersinia - Institut Pasteur, Paris (Prof. Dr. H.H. Mollaret).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi feito pelo método de difusão por discos (3).

Tabela 1 - Isolamento de *Versinia* sp. segundo os períodos de incubação empregados nos meios de enriquecimento.

Símbolos: * = Dias de repique para os meios seletivos; - = Ausência de *Y. enterocolitica* nos meios seletivos; + = Presença de *Y. enterocolitica* em pelo menos um dos meios seletivos; n = Não foi realizada a cultura neste meio; MRB = Meio de Rappaport modificado; CMB = Cold Mannitol Broth; PBS = Phosphate Buffer Saline

Resultados

Dos 265 espécimes fecais analisados, foram isoladas quatro amostras (43P, 102P, 124P e 184P) de *Yersinia enterocolitica* oriundas de 157 fezes de pacientes do grupo reumático e quatro (C12, 3C, 62C e 80C) de fezes de 108 pacientes do grupo controle, correspondendo as taxas de incidência de 2,54% e 3,70%, respectivamente. Entretanto, quando a estimativa se orienta apenas sobre os sorotipos reconhecidamente patogênicos (O:4, O:5, e O:6), as frequências, calculadas para os grupos, reumáticos, e controle, foram de 1,91 e 0,92%.

Na análise da eficiência dos meios de enriquecimento, o CMB possibilitou o isolamento de três amostras no 7º dia e mais três no 14º dia de incubação. A solução salina tamponada permitiu o isolamento de uma amostra no 7º dia e três na 14º; nenhuma foi isolada a partir do MRB (Tabela 1).

Quanto a atuação dos meios seletivos, associados aos meios de enriquecimento (Tabela 2), tomando por base o primo-isolamento, os resultados mais satisfatórios foram obtidos nos binômios CMB-SS (com três isolamentos no 7º dia, um no 14º e dois no 30º dia) e CMB-DCA (com dois no 7º dia, dois 14º, um no 30º e um no 60º dia).

Na caracterização bioquímica (Tabela 3), as particularidades se concentram nas reações positivas que as amostras 3C e 80C apresentaram nas provas da rhamnose e cítrato de Simmons. Quanto a definição dos biotipos (Tabela 4), salienta-se que a amostra C12, VP negativa, não possibilitou seu enquadramento pelo esquema de Niléhn (28), a amostra 80C, lecitinase negativa se caracterizou no biotipo 2 da classificação de Wauters (46). Todavia pela biotipificação, elaborada por Brenner (7) e pela análise do Centre National des Versinia, Institut Pasteur, as duas foram caracterizadas como *V. frederiksenii*. A identificação sorológica permitiu o reconhecimento dos sorotipos 0:4, 0:5, 0:6 e 0:13, no grupo de reumáticos, enquanto, do controle, obteve-se um 0:5, dois não aglutináveis e um auto-aglutinável.

Nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (Tabela 5), além da resistência da amostra 124P à tetraciclina e a sensibilidade da 62C à carbenicilina, citam-se os comportamentos heterogêneos frente à sisomicina, cloranfenicol, nitrofurantoína, fosfomicina, cefoxitina e colistina.

Tabela 2 - Comportamento das associações
meios de enriquecimento-seletivos, de
acordo com o período do primo-isolamen-
to.

Símbolos: * = Dias de incubação; - = Não isolamento de *V. enterocolitica*; ne = Não foi feito o enriquecimento; n = Não foi feito o plaqueamento

Tabela 3 - Caracterização bioquímica das oito amostras de *Yersinia* sp. isoladas. Provas realizadas a 29°C

	Identificação								
	43P	102P	124P	184P	C12	3C	62C	80C	
Glicose/Acido/Gás	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−	+/−
Lactose	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Sacarose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Adonitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Rafinose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Ramnose	−	−	−	−	−	+	−	+	+
Salicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trealose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Malonato	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hidrólise da Esculina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Redução do Nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CNPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina Descarbolixase	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Arginina Dihidrolase	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Orotina Descarboxilase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina Desaminase	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Citrato de Simmons	−	−	−	−	−	+	+	+	+
Produção de H ₂ S	−	−	−	−	−	−	−	−	−
KCN	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Indol	SIM	+	+	+	+	+	+	+	+
Água Peptonada	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lecitinase	+	+	+	+	+	+	+	+	−
Mobilidade 29°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobilidade 37°C	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Lactose (Meio O/F) OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+
F	−	−	−	−	−	−	−	−	−
VP	29°C	+	+	+	+	−	+	+	+
	37°C	−	−	−	−	−	−	−	−
VM	29°C	+	+	+	+	+	+	+	+
	37°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Finalmente, em relação aos dados dos indivíduos portadores de *Y. enterocolitica* (Tabela 6), salienta-se que a faixa etária mais comprometida foi entre 20 a 30 anos, com ligeira predominância do sexo feminino, e que as ocorrências clínicas estiveram representadas por valvulopatia reumática e poli-artrite, além de lupus eritematoso sistêmico e da artrite reumatóide juvenil.

Discussão

Em geral, a causa primária da baixa incidência de isolamento de *Yersinia enterocolitica* na América Latina, se deve ao discreto conhecimento sobre a biologia e ecologia do microrganismo, aliado à ausência de estudos sistemáticos e de uma metodologia de isolamento adequada. Por isso, foi utilizado na presente investigação, uma série de meios de cultura, que possibilitaram a análise criteriosa sobre os seus comportamentos, assim como, o reconhecimento de 8 amostras (3,01%) em 265 portadores humanos. Por outro lado, o resultado revelou que a presença da bactéria, em nosso meio, não deve ser considerada como fato tão inusitado, pois, além dos casos já notificados fortuitamente, assinala-se que Ferreira & col. (12) evidenciaram em fezes de 400 crianças com diarreia, 1,2% de portadores.

Tabela 4 - Caracterização das amostras de *Yersinia enterocolitica* e *Y. frederiksenii* isoladas, em sorotipo, lisotipo e biotipo.

Símbolos: A = Auto-aglutinável; NB = Não biotipificável; NAG = Não aglutinável pelos soros 0:1 e 0:34; Y.f. = *Yersinia frederiksenii*; IP = Identificação feita pelo Centro de Referência para *Yersinia*, Instituto Pasteur

Amostras isoladas	Sorotipo	Lisotipo	Biotipo			
			Niléhn	Wauters	Brenner	IP
43P	O:6	Xz	1	1	1A	1
102P	O:5	Xz	1	1	1A	1
124P	O:4	Xo	1	1	1A	1
184P	O:13	Xo	1	1	1A	1
C12	A	Xz	NB	1	1A	1
3C	NAG	Xz	1	1	Y.f.	Y.f.
62C	O:5	Xz	1	1	1A	1
80C	NAG	Xo	1	2	Y.f.	Y.f.

Ao compararmos o percentual de isolamento nos dois grupos estudados, temos uma incidência maior no grupo não reumático (4 amostras (3,70%) em 108 espécimes) em relação aos pacientes reumáticos (4 amostras (2,54%) em 157 espécimes). Este fato implicaria na suposição de que a *Y. enterocolitica* não estaria diretamente envolvida como agente de certos processos reumáticos, como advogam os autores escandinavos (1, 15, 18, 19). Todavia, verifica-se que os sorotipos mais incidentes em processos patológicos, predominam nos indivíduos com alterações reumáticas (1, 91%), em contraposição a 0,92%, no grupo controle. Dentro deste contexto, assinala-se as observações de Toma & col. (38), que caracterizam também o sorotipo O:13 como patogênico, o que dá ênfase aos resultados obtidos para o grupo de pacientes reumáticos.

Outro aspecto controvertido, se encontra na metodologia de isolamento, preconizadas por diferentes autores (6, 8, 10, 26, 27, 30 e 42), que aliada a carência de estudos sobre o assunto em nosso meio, nos levou a fazer um esquema de isolamento complexo.

Na análise dos meios de enriquecimento (Tabela 1), destaca-se o meio CMB, principalmente, quanto às estirpes oriundas de pacientes reumáticos. No total, sete amostras foram isoladas a partir do CMB, das quais, seis no período de 7 a 14 dias de incubação. O PBS permitiu, predominantemente, o reconhecimento das amostras do grupo controle, proporcionando o crescimento de seis, entre 30 a 60 dias a 4°C. A ausência de isolamento no MRB, estaria relacionada, segundo Wauters (42), ao fato que o meio é mais específico no enriquecimento dos sorotipos O:3 e O:9. Este fato, coaduna-se com Van Noyen & col. (39, 40), que relataram um aumento no percentual de isolamento de outros sorotipos, quando da utilização MRB X PBS. Ainda, Paterson & Cook (26), muito antes do advento de novas fórmulas, enfatizaram que o processo de crio-enriquecimento em meios pobres do ponto de vista nutricional, propicia melhores resultados para os membros do gênero *Yersinia*.

Em relação ao comportamento das associações de meios de enriquecimento e seletivos (Tabela 2), observa-se que o BSA propiciou o isolamento de quatro amostras das fezes do grupo controle, enriquecidas em PBS. No entanto, favoreceu também, o crescimento de outras enterobactérias (*E. coli*, *Enterobacter sp.*), dificultando a diferenciação das colônias.

O ágar TCBS modificado possibilitou uma nítida diferenciação das colônias de *Yersinia enterocolitica* em confronto com as de *Pseudomonas sp.* e *Proteus sp.* (sacarose negativas), e restringiu o crescimento de *E. coli*, *Klebsiella sp.* e *Enterobacter sp.*

Baseando-se no tempo de incubação necessário para o isolamento de sorotipos envolvidos em processos patológicos, observa-se que a associação CMB-SS modificado, foi discretamente mais eficiente que a CMB-DCA.

No processo de biotipificação (Tabelas 3 e 4), observa-se duas amostras do grupo *Yersinia enterocolitica* "like", caracterizadas como *Yersinia frederiksenii*, segundo a classificação proposta por Brenner (7) e no parecer do Centro de Referência para *Yersinia*, Instituto Pasteur. Pelo critério de Niléhn (25) ambas ficam no biotipo 1 e no esquema de Wauters (41), a amostra 80C classificou-se como biotipo 2.

Tabela 5 - Antibiograma das amostras de *Yersinia* sp. isoladas.

Símbolos: S = Sensível; MS = Moderadamente sensível; R = Resistente

Antimicrobiano	Padrão de sensibilidade das amostras							
	43P	103P	124P	184P	C12	3C	62C	80C
Ácido Nalidíxico	S	S	S	S	S	S	S	S
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	S
Carbenicilina	R	R	R	R	R	R	MS	R
Cefalotina	R	R	R	R	R	R	R	R
Cefoxitina	R	MS	MS	MS	S	R	R	S
Cloranfenicol	S	S	S	S	MS	S	S	S
Colistina	S	S	S	S	S	S	S	R
Estreptomicina	S	S	S	S	S	S	S	S
Fosfomicina	S	R	S	S	S	S	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	S
Kanamicina	S	S	S	S	S	S	S	S
Neomicina	S	S	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoína	S	S	S	S	S	S	MS	S
Novobiocina	R	R	R	R	R	R	R	R
Rifampicina	R	R	R	R	R	R	R	R
Sisomicina	R	R	S	S	R	S	S	S
Sulfametoxi-trimetropim	S	S	S	S	S	S	S	S
Sulfonamidas	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetraciclina	S	S	R	MS	S	MS	S	MS
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S
Vancomicina	R	R	R	R	R	R	R	R

Na biotipificação apresentada por Brenner (7) e posteriormente, por Bercovier & col. (4), as variedades são caracterizadas como *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii*, dando uma prospecção à epidemiologia, com relação ao papel destas novas espécies na patologia humana, que até o momento é controvertido. Assim, Kaneko & col. (16) enfatizaram a importância prática da biotipificação, que distingue as amostras patogênicas daquelas que se limitam a atuar na natureza.

A.V. frederiksenii foi isolada de dois indivíduos do grupo controle (Tabela 6), condição pela qual o microrganismo poderia ser um eventual constituinte da microbiota entérica.

Os sorotipos encontrados (Tabela 4) relacionam-se com os da América do Norte (2, 7), contrapondo-se aos europeus, onde predominam, acentuadamente, os sorotipos O:3 e O:9 (35). No nosso meio já foi relatada a ocorrência dos sorotipos O:3 (13, 14, 28) e O:5 (11, 36), mas sem menção aos tipos sorológicos O:4 e O:13, indicando que a variação do ecossistema analisado, implicaria na variação de frequência dos diversos sorotipos.

Tabela 6 - Dados gerais e específicos dos indivíduos com coproculturas positivas.

Símbolos: * = Paciente faleceu.

Nº	Sorotipo	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico clínico
43P*	O:6	23	F	Valvulopatia remítica
102P	O:5	53	M	Poli-artrite
124P	O:4	30	F	Lúpus eritematoso sistêmico
184P	O:13	20	M	Artrite reumatóide juvenil
C12	A	30	M	Normal
3C	NAG	72	F	Diabetes
62C	O:5	42	F	Hipertensão
80C	NAG	29	F	Pré-natal

Nos antibiogramas (Tabela 5) alerta-se a sensibilidade moderada à carbenicilina, observada na amostra 62C, sugerindo que o meio MRB, provavelmente, não seria adequado. Corroborando este fato, verifica-se pelo Projeto COBA (29), que nas duas amostras de *Y. enterocolitica* analisadas, uma é sensível à carbenicilina, assim como, Stumpf & col. (34) relatam a sensibilidade ao antimicrobiano de duas culturas, provenientes de crianças com diarréia.

É interessante salientar a presença *Y. enterocolitica* em pacientes com valvulopatia reumática e poliartrite (Tabela 6), considerados sinais cardinais "major" da febre reumática e, que segundo, Laitinen, Lerisalo & Allander (18) é indiferenciável da artrite por *Y. enterocolitica*. Assim, admite-se que o diagnóstico laboratorial conclusivo de febre reumática, só deveria ser efetivado após a exclusão da infecção por *Y. enterocolitica*.

Agradecimentos

Aos professores Ítalo Suassuna, Alexandre Adler e Lúcia Vilella do Serviço de Microbiologia e do Hospital das Clínicas da UERJ, ao Drs. Rogério Lorena de Oliveira e Adair Nazareth Callado da UNI-RIO pelos esforços dispensados para obtenção dos espécimes clínicos e ao Professor Dr. H.H. Mollaret pela análise das amostras isoladas.

Referências Bibliográficas

1. Aho, K.; Ahvonnen, P.; Lassus, A.; Sievers, K. & Tillikainen, A. - HLA 27 in reactive arthritis: a study of *Yersinia arthritis* and Reiter's disease. Arthr. Rheum., 17:521-526, 1974.
2. Alonso, J.M.; Bercovier, H.; Servan, J. & Mollaret, H.H. - Contribution to the study of the ecology of *Yersinia enterocolitica* in France. Contr. Microbiol. Immunol., 5:132-143, 1979.
3. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M.-Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
4. Bercovier, H.; Brenner, D.J.; Ursing, J.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R.; Alonso, J.M.; Carter, G.P. & Mollaret, H.H. - Characterization of *Yersinia enterocolitica* sensu stricto. Curr. Microbiol., 4:201-206, 1980.
5. Bottone, E.J. & Robin, T. - Prevalence of unique *Yersinia enterocolitica* in the area of the Mount Sinai Hospital, New York, N.Y. Contr. Microbiol. Immunol., 5:95-105, 1979.
6. Bowen, J.H. & Kominos, S.D. - Evaluation of a pectin agar medium for isolation of *Yersinia enterocolitica* within 48 hours. Amer. J. Clin. Pathol., 72:586-589, 1979.
7. Brenner, D.J. - Isolation and identification of *Yersinia enterocolitica*. Atlanta, Georgia, U.S. Department of Health, Center for Disease Control, 1978.
8. Christensen, E. & Jansen, G.P. - The isolation of *Yersinia enterocolitica* from stool specimens. Abs. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol. (New Orleans), p.80, 1977.
9. Costa, G.A. & Hofer, E. - Isolamento e identificação de enterobactérias. Monografia Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), 1972.
10. Dudley, M.V. & Shott Jr., E.B. - Medium for isolation of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol., 10:180-183, 1979.
11. Falcão, D.P. - Présence de *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis* en Amérique Latine. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 12:5-9, 1981.
12. Ferreira, M.C.S.; Otto, S.S.; Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Isolamento de *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica* associados à diarréias infantis no Rio de Janeiro. Resumos X Congr. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, p.62, 1979.

13. Fontes, C.F.; Toledo, M.R.F.; Reis, M.H.L.; Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. - Isolamento de uma amostra de *Yersinia enterocolitica* das fezes de uma criança na cidade de São Paulo. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 9:167-168, 1978.
14. Hofer, E.; Fernandes, M.F.T.; Veiga, T.; Oliveira, M.S. & Abraham, A.M. - Isolamento de *Yersinia pseudotuberculosis* e *Yersinia enterocolitica* de roedores capturados no município de Friburgo, R.J. Resumos X Congr. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, p.62, 1979.
15. Kalliomaki, J.L. & Leino, R. - Follow-up studies of joint complications in yersiniosis. Acta Med. Scand., 205:521-525, 1979.
16. Kaneko, K. & Hashimoto, N. - Five biovars of *Yersinia enterocolitica* delineated by numerical taxonomy. Int. J. Syst. Bacteriol., 32:275-287, 1982.
17. Kapperud, G.; Bergan, T. & Lassen, J. - Numerical taxonomy of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*: like bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol., 31:401-419, 1981.
18. Laitinen, O.; Lerisalo, M. & Allander, E. - Rheumatic fever and *Yersinia arthritis* criteria and diagnostica problems in a changing disease pattern. Scand. J. Rheumatol., 4:145-157, 1975.
19. Laitinen, O.; Tuuheja, J. & Ahvonen, P. - Polyarthritis associated with *Yersinia enterocolitica* infection: clinical features and laboratory findings in nine cases with severe joint symptoms. Ann. Rheum. Dis., 31:34-39, 1972.
20. Leading Article - Polyarthritis and *Yersinia enterocolitica*. Brit. Med. J., 2:404-405, 1975.
21. Legoux, J.L.; Legoux A.; Portier, H.; Maufoux, C. & Cortet, P. - *Yersinia enterocolitica*: un germe à rechercher devant toute diarrhée fébrile avec erythème houeux. Gastroenterol. Clin. Biol., 4:730-731, 1981.
22. Mollaret, H.H. - L'Infection humaine à *Yersinia enterocolitica* en 1970, à la lumière de 642 cas récents. Pathol. Biol., 19:189-205, 1971.
23. Mollaret, H.H.; Bercovier, H. & Alonso, J.M. - Summary of the data received at the WHO Reference Center for *Yersinia enterocolitica*. Contr. Microbiol. Immunol., 5:174-184, 1979.
24. Möller, V. - Simplified tests for some aminoacid decarboxylases and for the arginine dihydrolase system. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 36:158-172, 1955.
25. Niléhn, B. - Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 206(suppl):1-14, 1969.
26. Paterson, J.S. & Cook, R. - A method for recovery of *Pasteurella pseudotuberculosis* from feces. J. Pathol. Bacteriol., 85:241-242, 1963.
27. Peixotto, S.S.; Finne, G.; Hanna, M.O. & Vanderzant, C. - Presence growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in oysters, shrimp and crab. J. Food. Prot., 42:974-981, 1979.
28. Pizzolitto, A.C.; Giraldini, W.; Shimizu, M.T.; Galvão, S.H.M. & Falcão, D.P. - Isolamento do primeiro caso de *Yersinia enterocolitica* da origem humana no Brasil. Resumos VIII Congr. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, p.74, 1977.
29. Projeto Coba (Controle Bacteriológico Constante e Completo). Emissão anual de 1982. Sociedade Brasileira de Microbiologia/ Merck Sharp & Dohme, 1982.
30. Schiemann, D.A. - Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. Can. J. Microbiol., 25:1298-1304, 1979.
31. Schiemann, D.A. - Development of a two-step-enrichment procedure for recovery of *Yersinia enterocolitica* from food. Appl. Environ. Microbiol., 34:14-27, 1982.
32. Sheldon, P.J.H.; Mair, N.S. & Fox, E. - *Yersinia arthritis*: a clinical, immunological and family study of two cases. Ann. Rheum. Dis., 41:153-158, 1982.
33. Solem, J.H. & Lassen, J. - Reiter's disease following *Yersinia enterocolitica* infection. Scand. J. Infect. Dis., 3:83-85, 1971.
34. Stumpf, M.; Ricciardi, I.D.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Bernhoeft, M. - *Yersinia enterocolitica* as a cause of infantile diarrhoea in Rio de Janeiro, Brasil. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol., 11:383-384, 1978.
35. Swaminathan, B.; Harmon, M.C. & Mehlman, I.J. - A review: *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol., 52:151-183, 1982.

36. Toledo, M.R.F. & Falcão, D.P. - *Yersinia enterocolitica* fermentadora rápida de lactose: isolamento a partir de material de garganta. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11:136-137, 1980.
37. Toma, S.; Laffleur, L. & Deidrick, V.R. - Canadian experience with *Yersinia enterocolitica* (1966-1977). Contr. Microbiol. Immunol., 5:144-149, 1979.
38. Toma, S.; Wauters, G.; McClure, M.H.; Morris, G.K. & Weissfield, A.S. - O:13a, 13b: a new pathogenic serotype of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol., 20:843-845, 1984.
39. Van Noyen, R.; Vandepitte, J. & Wauters, G. - Nonvalue of cold enrichment of stools for isolation of *Yersinia enterocolitica* serotypes 3 and 9 from patients. J. Clin. Microbiol., 11:127-131, 1980.
40. Van Noyen, R.; Vandepitte, J.; Wauters, G. & Selderslachs, R. - *Yersinia enterocolitica*: its isolation by cold enrichment from patients and healthy subjectis. J. Clin. Pathol., 34:1052-1056, 1981.
41. Wauters, G. - Contribution a l'étude de *Yersinia enterocolitica*: thèse d'agrégé de l'enseignement supérieur. Université Catholique de Louvain, Belgique, 1970.
42. Wauters, G. - Improved methods for the isolation and the recognition of *Yersinia enterocolitica*. Contr. Microbiol. Immunol., 2:68-70, 1973.
43. Winblad, S. - Erythema nodosum associated with infection with *Yersinia enterocolitica*. Scand. J. Infect. Dis., 1:11-15, 1969.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE OS TESTES DE COAGULASE E TERMONUCLEASE NA IDENTIFICAÇÃO DO STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Oswaldo Durival Rossi Junior
Antonio Nader Filho
Luiz Augusto do Amaral

Deptº de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal
Unesp
Campus de Jaboticabal
14870 Jaboticabal SP, Brasil

& Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Deptº de Microbiologia
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal
Unesp

Resumo

Foram submetidas aos testes de coagulase e termonuclease, 345 cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de amostras de leite "in natura", com o objetivo de verificar a relação existente entre ambos os testes na identificação de cepas de *Staphylococcus aureus*. A elevada concordância (87,5%) e a diferença não significativa ($\chi^2= 20,025^{\text{NS}}$) dos resultados obtidos, sugerem a possibilidade de utilização tanto do teste de termonuclease como da coagulase na identificação do *Staphylococcus aureus*.

Summary

Comparative study between the coagulase and thermonuclease tests in the identification of S. aureus

Were submitted to the coagulase and thermonuclease tests, 345 strains of *Staphylococcus* sp. isolated from samples of milk "in nature", with the aim of verify the relation between both tests, in the identification of strains of *S. aureus*. The high concordance (87,5%) and the no significant difference ($\chi^2=0.025^{\text{NS}}$) of the results obtained suggest the possibility of the utilization of both of them, the coagulase or the thermonuclease tests, for the identification of strains of *Staphylococcus aureus*.

Introdução

A pesquisa da produção de coagulase é tida como a prova de referência (7) mais comumente utilizada para a diferenciação entre o *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos pertencentes à família *Micrococaceae* (2). Todavia, após o isolamento das colônias a serem identificadas, há necessidade de um período de tempo de 24 horas para a execução dessa pesquisa (4), fato esse que tem determinado a realização de algumas investigações com o intuito de desenvolver métodos alternativos mais rápidos.

As primeiras pesquisas realizadas com este objetivo são atribuídas a Lachica & col. (4), que estudaram a relação existente entre a produção de coagulase, lisozima, fosfatase, lipase, hemolisina e termonuclease. A elevada concordância (92,15%) verificada entre a produção de coagulase e a presença de termonuclease (desoxirribonuclease termoestável), motivou a Lachica & col. (5) adaptarem um teste simples e rápido, que permitia a detecção da presença de termonuclease, através da utilização do ágar azul de toluidina-DNA. Esta técnica é muito mais específica que o teste convencional da DNase, uma vez que as nucleases produzidas pelo *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus sp.*, são inativadas pelo tratamento térmico.

Assim sendo, de acordo com estes autores, a estabilidade térmica das nucleases produzidas pelos microrganismos pertencentes à família Micrococaceae, é exclusiva da nuclease produzida pelo *Staphylococcus aureus*. Por meio desta técnica, Barry & col. (2) verificaram que a concordância entre o teste da coagulase e da termonuclease foi da ordem de 99,9%.

Tendo em vista o exposto e considerando-se as poucas informações disponíveis sobre o comportamento do teste da termonuclease na diferenciação entre o *Staphylococcus aureus* e outros microrganismos pertencentes à família Micrococaceae, realizou-se o presente trabalho com o objetivo de verificar a relação existente entre os testes de coagulase e termonuclease, frente a cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de amostras de leite "in natura".

Material e Métodos

Foram submetidas aos testes da coagulase (1) e termonuclease (5), 345 cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de amostras de leite "in natura", procedentes de vacas reagentes ao California Mastitis Tests (6), e do leite do conjunto dos rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto, Estado de São Paulo.

Isolamento e identificação de cepas de *Staphylococcus sp.* - Para o isolamento das cepas pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foi utilizado o ágar Baird-Paker (Merck). As amostras de leite foram semeadas neste meio de acordo com a técnica recomendada por Demeter (3). Após a incubação a 37°C por 24-48 horas, havendo o crescimento de colônias com coloração negra, lustrosas, circundadas ou não por um halo de transparência, 5 delas foram submetidas à verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram. Assim, foram classificadas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus*, as colônias que se revelaram como cocos Gram-positivos em cachos (1).

Teste da coagulase - As cepas de *Staphylococcus sp.* foram semeadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI-Difco) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após o crescimento, juntava-se em um tubo de ensaio (10 x 70mm), 0,3ml desta cultura a 0,5ml de plasma de coelho citratado (diluído a 1:5 em solução fisiológica). Incubava-se a 37°C e realizava-se as leituras após 1, 2, 3, e 24 horas; o resultado foi considerado positivo quando ocorria a coagulação do plasma (1).

Teste da termonuclease - O restante da cultura de *Staphylococcus* em caldo de infusão de cérebro e coração foi submetido ao tratamento térmico em banho-fervente a 100°C durante 15 minutos. Em seguida, utilizando-se pipetas de Pasteur, preenchiam-se com essas culturas, os orifícios com diâmetro de aproximadamente 3mm existentes no Ágar Azul de Toluidina-DNA. Após incubação em câmara úmida a 37°C por 4 horas, efetuava-se a leitura; o resultado foi considerado positivo quando ocorria a presença de um halo róseo em torno do orifício (5).

Simultaneamente à execução dos testes da coagulase e termonuclease das cepas em estudo, foram realizadas provas controle, empregando-se culturas padrões de *S. aureus* e de *S. epidermidis* (1).

Tabela 1 - Comparação dos resultados obtidos pelas provas da coagulase e da termonuclease frente a cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas de leite "in natura".

Símbolos: $X^2 = 0,025$ (N.S.); G.L. = 1

Leitura	nº	Coagulase		Concordância
		Positiva	Negativa	
Positiva	221	199	22	
Negativa	124	21	103	87,5%

Resultados

Das 345 cepas de *Staphylococcus* sp. testadas, 221 (64,1%) foram consideradas como *S. aureus* pelo teste da coagulase e 220 (63,8%) pelo teste da termonuclease.

A comparação dos resultados, obtidos pelos testes da coagulase e termonuclease, mostra que o percentual de concordância estabelecido para ambos os testes foi de 87,5% (Tabela 1). A aplicação do teste Qui-Quadrado ($X^2 = \frac{\sum (fo-fe)^2}{fe}$) aos dados desta

Tabela não revelou diferença estatisticamente significativa ao nível de rejeição de 5%.

Discussão e Conclusões

A concordância (87,5%) verificada entre os testes da coagulase e da termonuclease foi inferior às citadas em literatura, a saber: 92,15% (4) e 99,9% (2). A elevada concordância entre o teste da coagulase e termonuclease, possibilita a utilização deste último na rotina de identificação de *S. aureus*, principalmente se levadas em consideração a facilidade de execução e a rapidez da leitura (2, 4).

O índice de concordância (87,5%), verificado neste trabalho, bem como a diferença não significativa entre os resultados obtidos por ambos os testes, sugerem a possibilidade da utilização de qualquer dos testes na rotina de identificação de cepas de *S. aureus*.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association. Committee on Microbiological Methods for Foods - Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, 1976.
2. Barry, A.L.; Lachica, R.V.F.; Atchison, F.W. - Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. Appl. Microbiol., 25:496-497, 1973.
3. Demeter, K.J. - Lactobacteriologia. Zaragoza, Acribia, 1969.
4. Lachica, R.J.F.; Weiss, K.F.; Deibel, R.H. - Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 18:126-127, 1969.
5. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C.; Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar-diffusion methods for detecting *Staphylococcae* nuclease activity. Appl. Microbiol., 21:585-587, 1971.
6. Schalm, O.W. & Noorlander, D.D. - Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Amer. Vet. Med. Res., 130:199-204, 1957.
7. Sperber, G.H. & Tatini, S.R. - Interpretation of the coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 29:502-505, 1975.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO MEIO 7H₁₀ COM SORO FETAL BOVINO NO CRESCIMENTO DE MICOBACTÉRIAS DO COMPLEXO M. TUBERCULOSIS

Leila de Souza Fonseca
 Marlei Gomes da Silva
 & Paulo Pinto Gontijo Filho

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

Resumo

O meio 7H₁₀ adicionado de soro fetal bovino (20%) e glicose (0,2%) apresentou os mesmos resultados que o meio comercial, contendo o aditivo constituído de oleato de sódio, albumina, glicose e catalase, no cultivo de amostras representativas do complexo *M. tuberculosis*.

Summary

*Evaluation of the effectiveness of the 7H₁₀ medium containing fetal bovine serum and dextrose on supporting the growth of the *M. tuberculosis* complex strains*

Agar base 7H₁₀ medium containing either 20% fetal bovine serum and 0,2% dextrose or commercial additive containing oleic acid, albumin, catalase and dextrose gave similar results on supporting the growth of the *M. tuberculosis* complex strains.

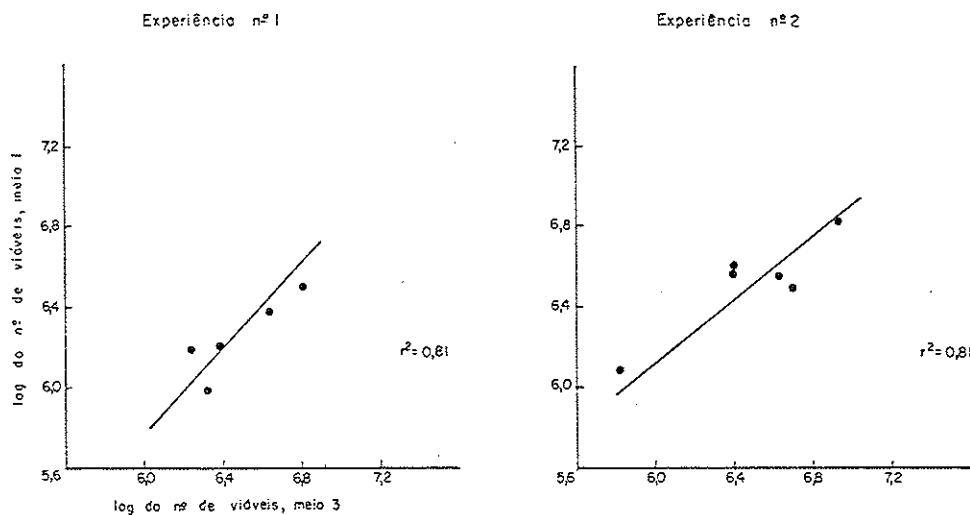
Os meios de cultura utilizados no isolamento do bacilo da tuberculose, a partir de espécimes clínicos ou contêm ovo ou contêm ágar. Os mais comumente empregados são o Loewenstein-Jensen e o 7H₁₀, respectivamente (3). Embora a sensibilidade dos dois não seja diferente, o meio contendo ágar é transparente, permite a visualização mais precoce das colônias (10-14 dias) e a identificação preliminar de *M. tuberculosis* e outras micobactérias através da morfologia colonial (4). Entretanto, o seu custo é proibitivo em países em desenvolvimento como o Brasil, em função, sobretudo, da presença de albumina bovina na sua fórmula (1).

Em razão da frequente necessidade do emprego do meio 7H₁₀ em investigações científicas, foi avaliada a possibilidade de substituir o aditivo comercial, contendo albumina e outras substâncias, por soro fetal bovino.

Diluições decimais sucessivas de suspensões de cinco amostras do complexo *M. tuberculosis* (H37Rv, *M. bovis*, BCG e três amostras de bacilo de tuberculose, recentemente isoladas) foram semeadas em triplicata em tubos contendo: a) base do ágar 7H₁₀ adicionada de soro fetal bovino (20ml para cada 180ml de base comercial rehidratada), glicose e catalase nas concentrações usuais; b) base do ágar 7H₁₀ adicionada de soro fetal bovino e glicose; c) meio de 7H₁₀ comercial (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), com o aditivo contendo albumina, oleato de sódio, glicose e catalase ("Oleic acid, albumin, dextrose & catalase - OADC"); e, d) Loewenstein-Jensen.

Os tubos foram incubados a 37°C e as leituras realizadas após 25 e 36 dias de incubação no primeiro e segundo experimento, respectivamente pela determinação do número de viáveis.

Figura 1 - Correlação entre contagem de viáveis realizadas no meio 1 (Middlebrook 7H10 com aditivo comercial) e meio 3 (base 7H10 adicionado de soro e glicose)



Os resultados dos meios contendo soro bovino, com ou sem catalase, estão reproduzidos nas Tabelas 1 (leitura de 25 dias) e 2 (leitura de 36 dias), equivalendo-se ao meio comercial em ambas as leituras. Ao analisarmos por regressão linear os resultados obtidos nos meios 1 e 3 obtivemos um coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,81 em ambas as experiências, evidenciando-se a equivalência entre os meios testados (Figura 1).

A utilização de meios a base de ágar é recomendada não só no diagnóstico laboratorial da tuberculose e micobacterioses, mas também na realização de estudos de morfologia colonial, testes de sensibilidade à quimioterápicos e em vários testes bacteriológicos com vistas a identificação das espécies do gênero *Mycobacterium* (2). Em síntese, um meio como o 7H10 é imprescindível ao bom funcionamento de um laboratório de micobacteriologia. É importante assinalar que embora essencialmente todos os meios de cultura apresentem maior sensibilidade e forneçam colônias maiores quando incubadas em atmosfera de gás carbônico (5-10%), os meios a base de ágar são ainda mais favorecidos por esta atmosfera. No entanto, a exposição à luz solar ou a estocagem em refrigerador por mais que quatro semanas podem resultar na sua deterioração e liberação de formaldeído, que pode matar ou inibir as micobactérias.

Tabela 1 - Contagem de viáveis de amostras do complexo *M. tuberculosis* após 25 dias de incubação.

Símbolos: a = Meio 1 (meio Middlebrook 7H20 + OADC); b = Meio 2 (Base 7H10 + soro fetal bovino + glicose + catalase); c = Meio 3 (Base 7H10 + soro fetal bovino + glicose); d = Meio 4 (Loewenstein-Jensen); e = Tubos contaminados

Amostra	Log da contagem de viáveis nos meios de cultura			
	a ^e	b ^b	c ^c	d ^d
B37RV	c ^e	6,49	6,47	6,59
M. bovis	6,65	6,68	6,81	6,69
BCG	6,38	6,34	6,64	6,51
Amostra 71	6,2	6,23	6,39	6,53
Amostra 216	6,19	6,43	6,23	6,47
Amostra 1562	5,99	6,26	6,32	6,49

Tabela 2 - Contagem de viáveis do complexo *M. tuberculosis* após 36 dias de incubação.

Símbolos: a = Meio 1 (meio Middlebrook 7H₁₀ + OADC); b = Meio 2 (Base 7H₁₀ + soro fetal bovino + glicose + catalase); c = Meio 3 (Base 7H₁₀ + soro fetal bovino + glicose); d = Meio 4 (Loewenstein-Jensen)

Amostra	Log da contagem de viáveis nos meios de cultura			
	1 ^a	2 ^b	3 ^c	4 ^d
H37RV	6,49	6,6	6,69	6,44
<i>M. bovis</i>	6,54	6,52	6,62	6,17
BCG	6,82	6,78	6,92	6,41
Amostra 71	6,6	6,4	6,4	6,45
Amostra 216	6,57	6,36	6,41	6,38
Amostra 1562	6,08	5,81	5,81	6,04

Referências Bibliográficas

1. Kleeberg, H.H. & Kubica, G.P. - Technical guide for establishing a simple bacteriological laboratory and for culturing tubercle bacilli. Scientific Committee for Bacteriology and Immunology of the International Union Against Tuberculosis.
2. Runyon, E.H.; Karlson, A.G.; Kubica, G.P. & Wayne, L.G. - *Mycobacterium*. In: - Lennette, E.H., ed. - Manual of clinical microbiology. 3.ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p.150-179, 1980.
3. Sommers, H.M.; McClatchy, J.K. & Morello, J.A. - Laboratory diagnosis of the mycobacterioses. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1983.
4. Strong, B.E. & Kubica, G.P. - Isolation and identification of *M. tuberculosis*. US Departament of Health and Human Services. Atlanta, Centers for Disease Control, 1981.

PESQUISA DE IMUNOCOMPLEXOS CIRCULANTES EM PACIENTES COM MENINGOCOCCEMIA

Sônia França Correia Barbosa
Maria das Graças Fernandes Adelino
Augusta Kiyomi Takeda
Lilia Fujimura Umekita

Seção de Imunologia
Instituto Adolfo Lutz
Caixa Postal 7027
01000 São Paulo SP, Brasil

& André Lomar

Unidade de Terapia Intensiva
Hospital Emílio Ribas
Av. Dr. Arnaldo, 165
01246 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Pesquisa de imunocomplexos circulantes foi realizada em 15 pacientes com meningococcemia apresentando complicações alérgicas, empregando o método de precipitação com polietilenoglicol. Os resultados foram expressos pela comparação das densidades ópticas (D0) dos eluatos e caracterização do antígeno polissacarídico nos imunocomplexos. Os pacientes analisados com meningococcemia apresentaram densidades ópticas aumentadas (0,570 a 0,257), quando comparadas àquela obtida em 33 soros controles (0,108) provenientes de doadores de Banco de Sangue. Foi possível em 12 casos a recuperação do antígeno polissacarídico da *N. meningitidis* destes complexos através da dissociação ácida e identificação pela reação de inibição de hemaglutinação.

Summary

Research of circulating immune complex in patients with meningococcemia

Circulating immune complex were investigated in 15 patients with meningococcemia with allergic complications, using polyethylene glycol precipitation test. The results were reported comparing optical density measurement of eluate and characterizing polysaccharide antigen of immune complexes. The patients with meningococcemia presented optical density higher (0.570 to 0.257) when compared with optical density (0.108) obtained from 33 control sera from Blood Banks donors. With relation to the polysaccharide antigen of *N. meningitidis* we could recovered in 12 cases from complexes by acid dissociation and characterized by hemagglutination inhibition test.

Introdução

Neisseria meningitidis tem sido encontrada em amostra de sangue e em biópsia de pele de pacientes com meningococcemia. Na meningococcemia as lesões cutâneas surgem rapidamente, às vezes horas após a instalação do processo infeccioso, caracterizado por febre alta, calafrios, mialgias, dores abdominais, mal-estar, artralgias, náuseas, vômitos e cefaléa (1).

As manifestações cutâneas que surgem, variam em número e tamanho conforme a gravidade do caso. Desta forma, o exantema pode ser máculo-papular, petequial ou purpúrico, com lesão de contorno irregular, coloração vinhosa podendo predominar nas extremidades dos membros e parte superior das coxas (7, 8). As petequias e púrpuras indicam comprometimento vascular, e casos mais graves podem levar a obstrução de artérias de maior calibre resultando em necrose. Histologicamente, o local da lesão da pele é caracterizado pela presença de fibrina com formação de trombos leucocitários e plaquetários no interior de pequenos vasos, com formação de edema e hemorragia por extravasamento do plasma e hemácias, com densa infiltração vascular e perivascular de neutrófilos (11). Estas lesões são histologicamente indistinguíveis da reação Shwartzman, que pode ser produzida experimentalmente pela endo toxina meningocócica (12).

Clinicamente, a doença meningocóccica é classificada em meningococcemia, quando surgem lesões cutâneas, enquanto a meningite meningocóccica, relaciona-se aos casos com quadro clínico e laboratorial de meningite sem lesão de pele. As duas formas podem vir associadas, sendo que a meningococcemia pode construir-se no quadro dominante ou preceder a meningite (1).

Grenwood & col. (5, 6) realizaram estudos em pacientes com meningococcemia, que desenvolveram artrites ou lesões cutâneas, e evidenciaram antígeno meningocóccico, em biópsias de pele examinadas. Estes achados sugerem que artrites e lesões cutâneas na meningococcemia são devidas à formação de complexo imune. Posteriormente, Dawis & col. (4) demonstraram imunocomplexos em soro e fluido sinovial em um único paciente com doença meningocóccica através de radioimunoensaio (Clq marcado) e precipitação com polietileno glicol.

Nosso trabalho teve por finalidade pesquisar em 15 pacientes apresentando lesões de pele, máculo-papulares, petequiais e purpúricas características da meningococcemia, a presença de imunocomplexos circulantes e tentar caracterizar a presença do antígeno *N. meningitidis*.

Material e Métodos

As amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e de soro de quinze pacientes internados no Hospital Emilio Ribas colecionadas durante a epidemia de meningite meningocóccica em 1974, com diagnóstico clínico de meningococcemia, foram submetidas aos seguintes testes:

Imunoelétroforese cruzada em acetato de celulose - A pesquisa direta de抗ígenos polissacarídicos A e C no LCR e no soro foi efetuada através da reação de imunoelétroforese cruzada (9) utilizando soro específico anti-*Neisseria meningitidis* dos Grupos A e C (13). A sensibilidade desta reação foi determinada, testando-se diferentes concentrações dos polissacarídeos A (*Meningococcus Group A - Vaccine - Inst Merieux, Lyon, France*) e C (*Meningococcus Group C - Vaccine - Merck, Sharp & Dohme*), frente aos soros específicos.

Reação de hemaglutinação passiva - Foi realizada nos soros utilizando-se a técnica descrita por Takeda & col. (14). As concentrações de polissacarídeos A e C utilizadas foram de 0,58µg/ml e 1,0µg/ml respectivamente (10).

Precipitação polietileno glicol - Os imunocomplexos circulantes investigados por precipitação do soro com polietileno glicol (PEG - Peso Molecular 6.000) de acordo com o método de Creighton & col. (3), com o tempo de precipitação de 18 horas à 4°C, obtendo-se concentração final PEG de 3%. A amostra foi centrifugada por 30

min, a 20.000g e o precipitado foi dissolvido em hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N em igual volume ao do soro empregado inicialmente. A densidade óptica foi determinada por leitura a 280nm em espectrofotômetro (Spectronic 600 + Bauch & Lomb).

Deteção do antígeno polissacarídico no imunocomplexo - Para uma parte do soro e LCR utilizou-se duas partes PEG a 3%. O precipitado resultante foi lavado três vezes com PEG 3%, e dialisado contra água destilada. Subsequentemente, o precipitado foi dissociado com igual volume do soro com tampão glicina 0,1M pH 2,8 e agitado continuamente por 30 minutos. A solução foi dialisada contra tampão salina borato pH 8,0 por 24 horas. Foi feita em seguida precipitação com sulfato de amônia a 33% e posterior, centrifugação a 2000g por 30 minutos. O sobrenadante foi retirado e dialisado em solução fisiológica 0,85% e concentrado em Lyfogel (Gelman Instrument Company, Ann Arbor Michigan), a um terço de seu volume. Realizou-se a pesquisa de antígeno neste sobrenadante, através da técnica de inibição de hemaglutinação (2), utilizando-se os polissacarídeos A e C, como controle da reação nas concentrações de 0,58 μ g/ml e 1,0 μ g/ml respectivamente.

Resultados

Em princípio salienta-se que a sensibilidade da reação de imunoelétroforese foi de 0,00125 μ g/ml para o polissacarídeo C e 0,003 μ g/ml com o polissacarídeo A.

Em todos os pacientes com diagnóstico clínico de meningococcemia foi detectado somente, a presença de antígeno polissacarídeo A tanto no L.C.R. como no soro, ou somente num dos espécimes. Estes resultados possibilitaram dividir os pacientes em três grupos. I - Referindo-se àqueles que apresentaram抗ígenos tanto no soro como no L.C.R.; II - Quatro pacientes no qual o antígeno foi caracterizado somente no soro, e III - Sete que revelaram antígeno apenas no L.C.R. (Tabela 1).

Observa-se que nos 15 pacientes clinicamente comprovados como portadores de meningococoemia, foi possível evidenciar o antígeno na circulação em oito casos (53,3%) enquanto que nos outros sete pacientes (46,6%) este acontecimento se positivou apenas no L.C.R.

Em nenhum dos casos analisados foi revelada a presença de anticorpos antipolissacarídico A ou C através da reação de hemaglutinação passiva.

A média das densidades ópticas nos soros dos pacientes do Grupo I foi de 0,570, no Grupo II foi de 0,572 e naqueles pacientes onde o antígeno só foi detectado no líquor - Grupo III, a densidade óptica foi de 0,257 enquanto, que no grupo controle foi de 0,108 (Tabela 2).

Quanto à recuperação do antígeno polissacarídico *N. meningitidis* do Grupo A foi de 100% no Grupo I, 50% no Grupo II e 86% no Grupo III.

Discussão

Tabela 1 - Distribuição dos pacientes de acordo com a presença de antígeno polissacarídico de *N. meningitidis* A no soro e no líquor por imunoelétroforese cruzada

Grupo	Nº pacientes	Antígeno polissacarídico
I	4	Soro e L.C.R.
II	4	Soro
III	7	LCR

Tabela 2 - Correlação das medidas (D.O.) dos imunocomplexos eluídos e a recuperação do antígeno polissacarídico A de *N. meningitidis* (grupo A) em cada um dos 3 grupos analisados

Grupos	D.O.	Antígeno polissacarídico	Total de casos
I	0,570	4	4
II	0,572	2	4
III	0,257	6	7
Controles banco de sangue	0,108	-	33

A pesquisa de imunocomplexos circulantes empregando a técnica de precipitação por polietileno glicol mostrou ser técnica de fácil execução podendo ser empregada em nosso meio, como triagem em patologias associadas a imunocomplexos. Neste trabalho, em 15 pacientes clinicamente diagnosticados como casos de meningococcemia, em 12 casos foi possível recuperar o antígeno específico de *N. meningitidis* Grupo A, através de precipitação do imunocomplexo, utilizando polietileno glicol seguido de dissociação ácida. A determinação quantitativa dos imunocomplexos precipitados por polietileno glicol e a densidade óptica obtida de seu produto dissociado nem sempre são conclusivas, uma vez que proteínas de alto peso molecular, como agregados de IgG, poderiam ser fator para falsos positivos.

Nos casos onde não foi possível recuperar o antígeno polissacarídico, poderia ser explicado como uma possível formação de imunocomplexos, representados por outros determinantes antigênicos não detectados pela inibição de hemaglutinação, obtidas através de produtos de lise bacteriana, como, por exemplo, complexos proteicos da parede celular interna e/ou externa.

Por outro lado, não fica excluída a hipótese de que essas lesões sejam devidas a endotoxinas, ou seja, lipopolissacarídeos da *N. meningitidis* responsáveis pela coagulação vascular, tão característica da meningococcemia fulminante.

Agradecimentos

Agradecemos a colaboração valiosa de Nereide Borges Boscardim que nos auxiliou na execução dos trabalhos de laboratório.

Referências Bibliográficas

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Controle de Meningite - Doença meningocócica. Brasília, Ministerio da Saúde, 1975.
2. Cohen, T.L. & Artenstein, M.S. - Hemagglutination inhibition for serogroups of *Neisseria meningitidis*. Appl. Microbiol., 23:289-292, 1972.
3. Creighton, W.D. & Lambert, P.H. - Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. J. Immun., 11:1219-1226, 1975.
4. Dawis, J.A.S. & Peters, N. - Circulating immune complexes in a patient with meningococcal disease. Brit. med. J., 2:1445-1448, 1976.
5. Greenwood, B.M.; Whittle, H.C. & Brycesson, A.D.M. - Allergic complications of meningococcal disease. II - Immunological investigations. Brit. med. J., 2:737-740, 1973.
6. Greenwood, B.M.; Onyewotu, I.I. & Whittle, H.C. - Lymphocytic infiltration of brains sleeping sickness. Brit. med. J., 2:1291-1292, 1876.
7. Guimarães, J.X. & Paula, A.B. - Doenças meningocócicas. In: - Prado, S.C.; Ramos, J.A. & Vale J.R. - Atualização terapêutica. 10.ed. São Paulo, Artes Médicas, p.55-61, 1975.
8. Hill, W.R. & Kinney, T.D. - The cutaneous lesions in acute meningococcemia. J. Amer. med. Ass., 134:513-518, 1947.
9. Palhares, M.; Gelli, D.S.; Almeida, M.C.R.; Takeda, A.K. & Taunay, A.E. - Pesquisa de polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* do Grupo C no líquido cefalorraquídiano por imunoeletroforese cruzada com acetato de celulose. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 33:85-89, 1973.
10. Simonetti, J.P.; Takeda, A.K.; Soerensen, B.; Ziquinatti, O. & Boscaridin, N.B. - Avaliação da resposta imunológica em animais quando inoculados com *Neisseria meningitidis* dos Grupos A e C. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 35/36:91-101, 1975/1976.
11. Sotto, M.N.; Langer, B.; Hoshino-Shimizu, S. & Brito, T. - Pathogenesis of cutaneous lesions in acute meningococcemia in humans: light immunofluorescent, and electron microscopic studies of skin biopsy specimens. J. Infect. Dis., 133:506-514, 1976.

12. Swartz, M.N. & Dodge, P.R. - Bacterial meningitis: a review of selected aspects. *New Engl. J. Med.*, 272:279-1003, 1965.
13. Takeda, A.K.; Taunay, A.E.; Scalabrini, L.G.P. & Castro I.O. - Anticorpos anti-polissacarídeo C de *Neisseria meningitidis*: detecção através da hemagiutinação passiva em soros de pacientes e vacinados. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 34:127-132, 1974.
14. Takeda, A.K.; Rossi, V.C.; Diniz, J.M.P.; Adelino, M.G.P. & Taunay, A.E. - Anticorpos anti-polissacarídeos de *Neisseria meningitidis* grupos A e C, em vacinados ou não. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 35/36:139-146, 1975/1976.

**DEMONSTRAÇÃO DE ATIVIDADE PESTOSA NO FOCO DA SERRA DOS
ÓRGÃOS (RIO DE JANEIRO, BRASIL) NO PERÍODO DE 1983 A 1984,
ATRAVÉS DE EXAMES SOROLÓGICOS EM ROEDORES**

Alzira Maria Paiva de Almeida
 Darci Pascoal Brasil
 Maria Eliane Bezerra de Melo
 Mineo Nakazawa
 & Célio Rodrigues de Almeida (Bolsista CNPq)

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

Resumo

No período de 1983 a 1984 foram encontrados no foco pestoso da Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brasil) 6 roedores com títulos de anticorpos hemaglutinantes contra a fração antigênica 1A da *Yersinia pestis*, $\geq 1/16$. A pesquisa do bacilo nos roedores e pulicídeos desse foco é recomendável.

Summary

Detection of plague activity in the focus of the "Serra dos Órgãos" (Rio de Janeiro, Brasil) by serological examination of rodents during the period from 1983 to 1984

Throughout the period of 1983 to 1984, 6 rodents originated from the focus of the "Serra dos Órgãos" (Rio de Janeiro, Brasil) have had serum haemagglutinating antibody titres to *Yersinia pestis* fraction 1A antigen $\geq 1/16$. The authors recommend that *Yersinia pestis* isolation from rodents and fleas should be carried out in the focus.

O foco de peste da Serra dos Órgãos abrange parte dos Municípios de Teresópolis e Nova Friburgo no Estado do Rio de Janeiro. Sua importância decorre principalmente da proximidade de grandes cidades e localização numa área de turismo e lazer em crescente desenvolvimento, além de intensa transformação ecológica, onde a floresta vem sendo substituída pelas plantações, que são rapidamente colonizadas pelos roedores. Embora se presuma que a infecção pestosa tenha atingido esta região desde o início do século, só após a criação do Serviço Nacional de Peste, que passou a documentar todos os casos dessa doença no País, se tem o registro exato de sua incidência. De 1938 a 1967 ocorreram 5 surtos humanos de peste nessa área a intervalos de 3 a 11 anos, tendo sido registrado 33 casos nos Municípios de Miguel Pereira, Teresópolis e Nova Friburgo (Coura, J.R. & col., Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 6:293-310, 1967). Desde então, nenhuma atividade pestosa foi constatada nesse foco, até 1971, quando foi realizado um inquérito sorológico nos roedores do Município de Teresópolis, pelo Departamento de Medicina Tropical da Universidade do Rio de Janeiro, em colaboração com "Plague Branch" do "Center for Disease Control" (CDC) em Fort Collins, no Colorado (USA). O exame de soros de 556 roedores, resultou no encontro de anticorpos antipestosos específicos, em 1 Akodon arvicoloides, 2 Akodon (*Thaptomys*) nigrita, 1 *Rattus rattus alexandrinus*, 2 *Rattus rattus* frugivorus, 4 *Oryzomys eliurus* e 1 *Oxymycterus quaster* (Barnes, A.M. & Hudson, B.W.-Relatório, OPAS/OMS, 1973).

No período de 1983 a 1984, no Laboratório de Peste do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz, Recife, Pernambuco foram examinados soros de 1855 roedores e 8 pequenos marsupiais, obtidos durante as atividades de vigilância da Campanha Contra a Peste, empreendida pela Superintendência de Campanhas do Ministério da Saúde (SU-CAM) nos Municípios de Teresópolis e Nova Friburgo. Utilizando a mesma técnica empregada no Laboratório do CDC (WHO, 444:23-25, 1970), inclusive a fração antigenica preparada naquele laboratório (Baker, E.E. & col. J. Immunol., 68:131-145, 1952), foram encontrados anticorpos hemaglutinantes contra a fração antigenica purificada 1A, específica da *Yersinia pestis*, em 6 roedores. Os exames dos soros de um paciente suspeito de peste do Município de Sumidouro e de 4 de Nova Friburgo, realizados no ano de 1984, resultaram negativos para a peste. A Tabela 1, mostra a distribuição, por espécie, do número de animais examinados sorologicamente e a origem dos que resultaram positivos. O encontro de anticorpos antipestosos específicos, nos roedores, leva-nos, a admitir que a infecção persiste neste foco e que a possibilidade de eclosão de outros surtos humanos da doença, continua a existir. Recomenda-se portanto, o prosseguimento das atividades de vigilância e a realização da pesquisa bacteriológica da *Yersinia pestis*, na região, pois Cavanaugh, D.C. & col. (Bull. Wld. Hlth. Org., 42:451-459, 1970) mostram evidência de que sempre que são detectados anticorpos antipestosos nos roedores de uma área, o encontro do bacilo entre estes animais e suas pulgas, também é possível; em contrapartida, nos locais onde a pesquisa sorológica resulta negativa, o bacilo também não é encontrado.

Tabela 1 - Distribuição do número de soros de roedores do Foco pestoso da Serra dos Órgaos examinados no período de 1983 a 1984 e que apresentavam anticorpos hemaglutinantes contra a fração antigenica 1A da *Yersinia pestis*.

Símbolos: * = Marsupiais

Origem	1983		1984		Procedência dos roedores positivos
	Exam.	Pos. (Título)	Exam.	Pos. (Título)	
<i>Rattus r. alexandrinus</i>	9	-	64	2 (1/512) 1 (1/2048)	Sítio Centenário, Nova Friburgo maio/1984
<i>Rattus r. frugivorus</i>	10	-	25	-	
<i>Rattus rattus rattus</i>	49	1 (1/16)	117	-	Faz. Vieiras, Teresópolis novembro/1983
<i>Hus m. brevirostris</i>	9	-	7	-	
<i>Akodon a. cursor</i>	149	-	571	1 (1/64) 1 (1/64)	Sítio Conquista, Nova Friburgo maio/1984 Sítio Salinas, Nova Friburgo novembro/1984
<i>Hectomys s. olivaceus</i>	32	-	164	-	
<i>Oryzomys eliurus</i>	121	1 (1/16)	233	-	Faz. Córrego Grande, Nova Friburgo agosto/1983
<i>Oryzomys ratticeps</i>	-	-	1	-	
<i>Oryzomys quaster</i>	20	-	253	-	
<i>Thaptomys nigrita</i>	5	-	6	-	
<i>Zygodontomys l. pixuna</i>	-	-	1	-	
<i>Cavia aperea aperea</i>	1	-	5	-	
<i>Euryzygomathomys guiarra</i>	-	-	3	-	
<i>Didelphis paraguaiensis*</i>	-	-	1	-	
<i>Phyllander sp.*</i>	-	-	7	-	
Total	405	2	1458	4	

PRODUÇÃO DE HEMOLISINA POR AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOXIGÊNICAS DE ORIGEM SUÍNA E SUA INFLUÊNCIA NAS REAÇÕES DE IMUNOHEMOLISE PARA A DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA TERMO-LÁBIL (LT)

Lucila Costallat Ricci
 Rita C.A. Nascimento Marton
 & Antonio Fernando Pestana de Castro

Deptº de Microbiologia e Imunologia
 Instituto de Biologia Unicamp
 Cidade Universitária Barão Geraldo
 13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

Esta investigação teve como propósito, pesquisar em meios de cultura, se amostras hemolíticas de *Escherichia coli* produziam hemolisina (H) e no que esta produção poderia interferir na detecção da enterotoxina termo-lábil de *E. coli* em reações de imunohemólise. No meio de casamino ácido-extrato de levedura (CAYE), a H não é produzida, mesmo com adição de hemácias de carneiro (HC), o que provoca inclusive, uma diminuição de LT. No meio de "Brain Heart Infusion" a produção de LT é menor do que no de CAYE e a adição de HC estimula a produção de H. Esta também é estimulada pela simples adição de ágar. Devido a isso, não recomendamos a utilização de meios sólidos e a adição de HC para a produção de LT, quando se usam reações que utilizem hemácias de carneiro na sua detecção.

Summary

Haemolysin production by enterotoxigenic Escherichia coli of porcine origin and its influence in hemolytic tests for thermolabile (LT) enterotoxin detection

The purpose of this investigation was finding out in which culture media hemolytic *Escherichia coli* strains produce haemolysin (H), which could interfere with the results of the reactions of immune hemolysis for detection of thermolabile (LT) enterotoxin from *E. coli*. In casamino acids-yeast extract (CAYE) medium, H is not produced even in the presence of red blood cells (HC), what, on the other hand, causes a decreases of LT production. In Brain Heart Infusion medium the yield of LT is lower and the addition of HC stimulates H production. This is also favoured by the inclusion of agar, what means that solid media as well as HC are not advisable for LT production, when IH reactions are used for its detection.

Introdução

Amostras de *Escherichia coli* produtoras da enterotoxina termo-lábil (LT), podem ser atualmente detectadas por uma grande variedade de testes (3, 5, 6). Entre as reações mais simples, usadas para a detecção dessa enterotoxina, destacam-se as de

imunohemólise (IH), em especial a imunohemólise passiva (IHP) e imunohemólise radial (IHR) (2, 3, 9).

Uma das críticas que se tem feito às reações de IH é que amostras de origem suína LT⁺ são em sua maioria, hemolíticas, o que poderia interferir nos resultados dessas reações (1). Contudo, na prática esse fenômeno não tem sido por nós observado, tendo sido analisado o resultado de cada reação de IH, com um controle do potencial hemolítico da mesma.

O objetivo do presente trabalho foi verificar porque a hemolisina (H) de amostras enterotoxigênicas de *E. coli* não influencia os resultados das reações de IH, normalmente utilizadas para a detecção de LT.

Material e Métodos

Amostras bacterianas - Foram selecionadas oito amostras de *Escherichia coli*, de origem suína, sendo sete hemolíticas e uma não hemolítica. Dentro as amostras, seis eram LT⁺ H⁺, a saber 1, 3, 37 (pertencentes ao sorogrupo 0149: K91, K88ac), G7/3, G7/12 (pertencentes ao sorogrupo 08:K87, K88ab) a V79 (do sorogrupo 035:K?). As amostras restantes foram: E57, LT⁻ H⁺ (sorogrupo 0138: K81) e 104, LT⁻ H⁻ (sorogrupo não identificado).

Meios de cultura - Nos diversos experimentos realizados, as amostras mencionadas foram incubadas a 37°C por 24h nos seguintes meios: casamino ácido-extrato de levadura - CAYE (4); CAYE mais 5% de sangue desfibrinado de carneiro - CAYE-HC; Brain Heart Infusion - BHI; BHI mais 5% de sangue desfibrinado de carneiro - BHI-HC; ágar-chocolate - AC; ágar sangue - AS; meio de Biken (7) e ágar nutritivo - AN.

Quando em meio líquido, a incubação foi feita sob agitação a 150rpm. As culturas em meio líquido foram centrifugadas a 5.000xg por 45 minutos, separando-se os sobrenadantes que foram filtrados em Millipore (0,45μm).

Os cultivos em meios sólidos foram ressuspensos em salina estéril, na proporção de 6ml por placa, tendo sido as suspensões resultantes tratadas de modo idêntico ao descrito acima.

Análise da produção de hemolisina - Os sobrenadantes oriundos dos meios líquidos e sólidos foram analisados quanto à produção de hemolisina, através de duas técnicas básicas. Técnica A - em placas de ágar sangue contendo, cada uma, 18ml de meio, com cerca de 6mm de espessura, foram feitos sob condições de esterilidade, orifícios de 7mm de diâmetro, onde foram aplicados 150μl dos sobrenadantes estéreis. Após 18h a 37°C, a presença de hemolisina foi observada pelos halos de hemólise em torno dos orifícios. Técnica B - de maneira semelhante à técnica normalmente utilizada para a IHR (5), os sobrenadantes foram analisados em placas contendo agarose a 1% em tampão trietanolamina pH 7,4 com 0,7% de hemácias de carneiro, tendo como conservante azida sódica 0,02%. As placas permaneceram em câmara úmida durante 18h, tendo sido então, colocadas a 37°C por 2 horas. Após esse tempo, foi observada a presença de halos de hemólise ao redor dos orifícios de 4mm feitos nas placas onde 16μl dos sobrenadantes haviam sido aplicados.

Análise da LT - A enterotoxina LT foi analisada em placas de agarose, pela IHR, da mesma forma que na técnica B acima. Para a caracterização da produção de LT, utilizamos os soros anti-cólera, anti-LT-humana e anti-LT-suína. Após a adição do complemento diluído 1/10, as placas foram incubadas a 37°C por 2h, quando era feita a leitura dos halos de hemólise, cujo diâmetro é proporcional à quantidade de enterotoxina LT produzida pelas amostras em estudo (9). Quanto à produção da enterotoxina LT, diâmetros de hemólise superiores a 7mm foram considerados como positivos ou + e inferiores a esse, como fracamente positivos ou (+).

Tabela 1 - Resultados dos testes quanto a produção de hemolisina e de enterotoxina LT de *Escherichia coli*.

Símbolos: 1 = Análise da produção de hemolisina em placas de ágar sangue; 2 = Análise da produção de hemolisina em placas de hemólise radial (agarose + hemácias de carneiro); 3 = Produção de LT analisada pela técnica de IHR; 4 = Casamino ácidos-extrato de levedura; 5 = Casamino ácidos-extrato de levedura mais 5% de sangue de carneiro; 6 = Brain Hearth Infusion; 7 = Brain Heart Infusion mais 5% de sangue de carneiro; 8 = Ágar sangue; 9 = Ágar chocolate; 10 = Meio de Biken; 11 = Ágar nutritivo

Amostras Caract.	Testes realizados	CAYE ⁴	CAYE-HC ⁵	BHI ⁶	BHI-HC ⁷	AS ⁸	AC ⁹	Biken ¹⁰	AN ¹¹
		H em AS ¹	-	-	+	+	+	-	-
1 H ⁺ LT ⁺	H em HR ²	-	-	-	-	-	-	+	+
	LT ³	+	-	-	-	-	-	+	+
8 H ⁺ LT ⁺	H em AS	-	-	-	+	+	+	+	-
	H em HR	-	-	-	-	-	+	-	+
	LT	+	(+)	-	-	-	+	-	+
37 H ⁺ LT ⁺	H em AS	-	-	-	-	+	-	+	-
	H em HR	-	-	-	-	-	+	-	+
	LT	+	(+)	(+)	-	-	+	+	+
G7/3 H ⁺ LT ⁺	H em AS	-	-	-	+	+	-	-	+
	H em HR	-	-	-	-	-	*	-	-
	LT	+	-	-	-	-	+	+	+
G7/12 H ⁺ LT ⁺	H em AS	-	-	-	+	-	+	-	-
	H em HR	-	-	-	-	-	+	+	-
	LT	+	(+)	+	-	-	+	+	+
V79 H ⁺ LT ⁺	H em AS	-	-	-	+	-	-	+	-
	H em HR	-	-	-	-	-	-	+	-
	LT	(+)	-	-	-	-	(+)	-	+
ES7 H ⁺ LT ⁺	H em AS	-	-	-	-	-	-	-	-
	H em HR	-	-	-	+	-	-	+	-
	LT	-	-	-	-	-	+	-	-
104 H ⁻ LT ⁺	H em AS	-	-	-	-	+	+	-	-
	H em HR	-	-	-	-	+	+	-	-
	LT	-	-	-	-	+	+	-	-

Resultados

Verificou-se que no meio de CAYE, nenhuma das amostras produziu hemolisina, confirmado-se, porém, a produção de LT em todas as amostras enterotoxigênicas. No meio de CAYE-HC houve efeito negativo na produção de LT, pois apenas três amostras (8, 37 e G7/12) produziram esta enterotoxina, fracamente (+).

Nos sobrenadantes dos meios restantes, a presença de hemolisina foi, em várias amostras, detectada pela técnica A e/ou B. Os resultados quanto a produção de hemolisina e LT, encontram-se na Tabela 1.

Discussão

Nas preparações obtidas com o meio de CAYE, normalmente utilizado para o preparo dos extratos a serem analisados por técnicas de IH, não houve produção de hemolisina, detectável pelas técnicas A e B.

A presença de HC em meio líquido deve ter influenciado a detecção de LT nos meios de CAYE-HC, provavelmente pelo fato das hemácias de carneiro conterem o gangliosídeo GM1 (Ricci, L.C. & de Castro, A.F.P. - Indirect haemagglutination test for the

detection of thermolabile (LT) enterotoxin from *Escherichia coli* (submetido para publicação), o que provocaria a adsorção da LT extracelular, presente nos sobrenadantes, às HC. Durante a centrifugação, para preparo dos sobrenadantes, as hemácias arrastariam grande parte da enterotoxina LT produzida. Comparando-se os resultados BHI e BHI-HC, nota-se que as HC, adicionadas ao meio de CAYE, não influenciaram a produção de hemolisina. Por outro lado, no meio de BHI, apenas duas amostras (37 e G7/12) foram positivas para LT e no BHI-HC, todos os resultados foram negativos, provavelmente pelo mesmo mecanismo mencionado acima.

Analisando-se em conjunto os resultados observados com preparações obtidas dos meios sólidos, observa-se que as oriundas de cultivo em AS foram H⁺, pela técnica A (1, 8, 37 e G7/3). Ainda com relação à produção de LT, talvez pelo mesmo motivo já mencionado, ou seja presença de GM1 em HC, todas as preparações obtidas a partir de AS foram negativas para LT.

Entre seis amostras LT⁺ cultivadas em AC, cinco produziram LT no meio, em quantidades detectáveis pela IHR. No mesmo meio, a produção de hemolisina parece ter sido estimulada. Dentre as amostras, três foram H⁺, pela técnica A e duas pela técnica B.

Considerações semelhantes podem ser feitas quanto ao meio de Biken e AN. No primeiro caso, houve produção de LT, por quatro amostras (1, G7, G7/3 e G7/12) e de hemolisina, por seis das sete amostras.

Embora a técnica A pareça ser mais sensível que a B, para a detecção de hemolisina, não temos justificativa razoável para explicar porque alguns resultados foram positivos na técnica B e negativos na A, como os observados em AN.

Tendo em vista os resultados no meio de BHI-HC, AS e AC, parece-nos evidente que a presença de sangue de carneiro funcione como agente indutor da produção de hemolisinas. Por outro lado, os resultados observados no meio de Biken e AN levam-nos a supor que o ágar também seja importante nessa indução.

Quanto à enterotoxina LT, podemos concluir que a presença de sangue de carneiro e ágar, são contra-indicados quando se pretende produzi-la e detectá-la por recursos de IH. Finalizando-se, nossos resultados deixam claro que, como não ocorre produção de hemolisina no meio de CAYE, preparações obtidas a partir deste meio podem ser perfeitamente usadas nas reações de IH para a detecção de LT.

Agradecimentos

O presente trabalho recebeu auxílio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e da Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Referências Bibliográficas

1. Bentin, L.; Bode, L.; Richter, T.; Peltre, G. & Stephan, R. - Rapid visual detection of *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* heat-labile enterotoxins by nitrocellulose enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 19:371-375, 1984.
2. Castro, A.F.P. de; Serafim, M.B.; Gomes, J.A. & Gatti, M.S.V. - Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 12:714-717, 1980.
3. Donta, S.T.; Moon, W.H. & Whipp, S.C. - Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183:334-336, 1974.
4. Evans Jr., D.J.; Evans, D.G. & Gorbach, S.L. - Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.*, 8:725-730, 1973.
5. Greenberg, H.B.; Sack, D.A.; Rodrigues, W.; Sack, R.B.; Wyatt, R.G.; Kalica, A.R.; Horwood, R.S.; Chanock, R.M. & Kapikian, A.Z. - Microtiter solid-phase radioimmunoassay for detection of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, 17:541-545, 1977.

6. Guerrant, R.L.; Brunton, L.L.; Schnaitman, T.C.; Rebhun, L.I. & Gilman, A.G. - Cyclic adenosine monophosphate and alteration of chinese hamster ovary cell morphology: a rapid sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infec. Immun.*, 10:320-327, 1974.
7. Honda, T.; Taga, S.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - Modified EELK test for detection of heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 13:1-5, 1981.
8. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Leandro, M.B. & Monteiro, A.R. - A single radial immune hemolysis (SRIH) test for the detection of thermolabile (LT) enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 14:473-478, 1981.
9. Yano, T.; Oliveira, M.S.; Almeida, A.C.P. & Castro, A.F.P. de - Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the radial immune hemolysis test: a modification for clinical use. *Med. Microbiol.*, 171:171-178, 1982.

PREVALÊNCIA DE CAMPYLOBACTER JEJUNI E *C. COLI* EM FEZES NORMAIS E DIARRÉICAS DE CÃES EM SÃO PAULO

Arthur Gruber*

Eduardo do Nascimento Mós

Edison Luís Durigon

& Alda Maria Backx Noronha**

Deptº de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374/29

Cidade Universitária USP

05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Um total de 100 amostras fecais de cães foram pesquisadas, obtendo-se o isolamento de *Campylobacter* em 8 das 27 amostras diarréicas (29,6%) e 6 das 73 normais (8,2%). Filhotes demonstraram maior prevalência do que adultos.

Summary

Prevalence of Campylobacter jejuni and C. coli in normal and diarrhoeic faeces from dogs in São Paulo

From 100 samples of dog faeces, 14 strains of *Campylobacter* were isolated as follows: 8 from 27 diarrhoeic faeces (29.6%) and 6 from 73 normal faeces (8.2%). Puppies demonstrated more prevalence than adults.

Introdução

A partir de 1957, foi demonstrado que *Campylobacter jejuni* e *C. coli* estão associados a doenças entéricas em humanos, principalmente crianças. Levantamentos realizados indicam que a participação desses gérmenes rivaliza-se com a da *Salmonella* e *Shigella*. Como fontes de infecção, entre outras, foram implicados animais de fazenda, cães e gatos, alimentos de origem animal (carne, leite), carcaças de mamíferos e de aves, água (1, 4, 12, 13, 15).

A associação entre a infecção causada por *Campylobacter*, no cão e no homem, foi evidenciada por diversos autores, que relataram a prevalência maior nas fezes de filhotes, cães vadios e criados em canis, quando comparada à de adultos criados em residências (2, 14). Para uns, a prevalência também é maior em cães diarréicos (6, 7, 8, 11, 16) mas, para outros autores, seria semelhante à de cães sadios (3, 5, 9). A infecção no cão também foi estudada, havendo ainda incertezas em relação ao grau de participação do germen. No Brasil, há poucos levantamentos de *Campylobacter* (6, 12). Assim, foi realizada a prospecção dessa bactéria a partir de fezes de cães, sadios e diarréicos, atendidos pelo Ambulatório da Faculdade de Medicina e Veterinária e Zootecnia da USP.

* Acadêmico da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, estagiário com bolsa de iniciação científica FAPESP; ** Acadêmica da FMVZ/USP, estagiária.

Tabela 1 - Isolamentos de *Campylobacter* de amostras de cães normais e diarréicos, segundo a idade

Idade (meses)	Cães normais		Cães diarréicos		Total	
	Amost.	Isol. (%)	Amost.	Isol. (%)	Amost.	Isol. (%)
0 — 6	23	5 (21,7)	17	6 (35,3)	40	11 (27,5)
> 6	50	1 (2,0)	10	2 (20,0)	60	3 (5,0)
Total	73	6 (8,2)	27	8 (29,6)	100	14 (14,0)

Material e Métodos

Realizou-se a coleta de 100 amostras fecais de cães, com o uso de zaraagatoa estéril, introduzida no ânus, até contato com o reto, e posterior transferência para tubos de cultura 12 x 100mm, contendo 2ml de caldo tioglicolato. Dados referentes ao cão e à presença ou não de enterite foram anotados.

Inoculação foi feita em meio seletivo semi-sólido Campy-thio (1) para enriquecimento, com incubação a 4°C por 24 horas. Procedeu-se à subcultura em meio sólido de isolamento Campy-BAP (1), em duplicata, com incubação a 37 e 42°C, por 48 horas. Atmosfera de microaerofilia foi obtida por método com lá de aço (10). A identificação baseou-se em morfologia típica em S ou asa de gaivota, visualizada em esfregaços das colônias suspeitas, corados pelo método de Gram. Testes complementares incluiram oxidase, catalase, crescimento a 25°C, produção de H₂S em meio TSI e em caldo tioglicolato, pelo método das fitas de papel com acetato de chumbo, hidrólise do hipurato de sódio, e sensibilidade ao ácido nalidíxico e à cefalotina (15). Placas negativas foram desprezadas, após 72 horas de incubação.

Resultados e Discussão

Das 100 amostras de fezes pesquisadas, foram isoladas e identificadas, segundo características morfológicas, tintoriais e bioquímicas, 12 cepas de *Campylobacter jejuni* e 2 de *C. coli*. Todas as cepas se mostraram Gram-negativas, com morfologia espiralóide em S ou asa de gaivota, e com formas cocóides nas culturas com mais de 48 horas. A temperatura de 42°C mostrou ser mais eficiente do que 37°C, para o primo-isolamento das espécies termófilas de *Campylobacter* (*jejuni* e/ou *coli*), originando crescimento mais amplo, com tendência à formação de véu, e com menor número de contaminantes.

Cães filhotes apresentaram 27,5% de isolamentos contra apenas 5,0% nos adultos (Tabela 1). Da mesma forma, os diarréicos tiveram maior prevalência (29,6%) do que animais saudáveis (8,2%). Cães filhotes com diarréia mostraram a maior taxa de isolamento, com 35,3%, enquanto adultos saudáveis só lograram 2,0%. Esses dados são estatisticamente significantes ($P < 0,025$). Maior prevalência em animais diarréicos está de acordo com os resultados obtidos por alguns autores (6, 7, 8, 11, 16) e contrasta com outros (3, 5, 9). Contudo, confirma-se o fato de filhotes diarréicos serem frequentemente carreadores desses germes (2, 3, 7, 8, 9, 11, 14, 16), representando uma fonte de infecção ao homem, principalmente crianças. Medidas de higiene em relação a esses animais devem ser tomadas, a fim de evitar contaminação. Quanto à infecção no cão, maiores estudos devem ser feitos para se mensurar a possível patogenicidade desses microrganismos.

Agradecimentos

Contamos com a colaboração dos veterinários do Ambulatório da FMVZ e do Prof. Dr. Omar Miguel.

Referências Bibliográficas

- Blaser, M.J.; Berkowitz, I.D.; LaForce, F.M.; Cravens, J.; Reller, L.B. & Wang, W.L.L. - *Campylobacter enteritis: clinical and epidemiologic features*. Ann. intern. Med., 91:179-185, 1979.

2. Blaser, M.J.; Cravens, J.; Powers, B.W. & Wang, W.L.L. - *Campylobacter enteritis* associated with canine infection. Lancet, II:979-981, 1978.
3. Bruce, D. - *Campylobacter* isolations from households dogs. Vet. Rec., 112:16, 1983.
4. Bruce, D. & Zochowski, W. - *Campylobacter* infections in cats and dogs. Vet. Rec., 107:200-201, 1980.
5. Ciuchini, F.; Sala, V.; Buonavoglia, C. & Pistoia, C. - Isolation of *Campylobacter jejuni* from samples faeces in dogs of Rome. La Clinica Veterinaria, 106:121-124, 1983.
6. Ferreira, M.C.S.; Ribeiro, V.L.S. & Ricciardi, I.D. - *Campylobacter*, dogs and human enteritis (letter). Vet. Rec., 105:451, 1979.
7. Fleming, M.P. - Association of *Campylobacter jejuni* with enteritis in dogs and cats. Vet. Rec., 113:372-374, 1983.
8. Fox, J.G.; Moore, R. & Ackerman, J.I. - *Campylobacter jejuni* - associated diarrhea in dogs. J. Am. Vet. Med. Ass., 183:1430-1433, 1983.
9. Hosie, B.D.; Nicolson, T.B. & Henderson, D.B. - *Campylobacter* infections in normal and diarrhoeic dogs. Vet. Rec., 105:80, 1979.
10. Magalhães, M.; Andrade, M.A. & Silva, G.P. - Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. Rev. Microbiol., 13:124-125, 1982.
11. Nair, G.B.; Sarkar, R.K.; Chowdhury, S. & Pal, S.C. - *Campylobacter* infection in domestic dogs. Vet. Rec., 116:237-238, 1985.
12. Ricciardi, I.D.; Ferreira, M.C.S.; Otto, S.S.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Fontes, C.F. - Thermophilic *Campylobacter*-associated diarrhoea in Rio de Janeiro. Rev. Bras. Pesq. Méd. Biol., 12:189-191, 1979.
13. Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. Brit. Med. J., 2:9-11, 1977.
14. Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis* in dogs and cats: a new zoonosis. Vet. Res. Comm., 5:13-19, 1981.
15. Smibert, R.M. - Genus *Campylobacter*. In: - Krieg, N.R. & Holt, J.G., eds. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, William & Wilkins, p.111-118, 1984.
16. Weber, A.; Lemke, C.; Schafer, R.; Seifert, U. & Berg, H. - Nachweis von *Campylobacter jejuni* in Kotproben von Hunden. Berl. Munch. Tierärztl. Wschr., 96:232-234, 1983.

DESCRÍÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS ACÉTICAS ISOLADAS DA FERMENTAÇÃO DO CACAU, COM BASE EM UMA ANÁLISE NÚMÉRICA

Flávia Maria Lopes Passos
 & Frederico José Vieira Passos

Divisão de Tecnologia e Engenharia Agrícolas
 Centro de Pesquisas do Cacau
 CEPLAC
 Caixa Postal 7
 45600 Itabuna BA, Brasil

Resumo

Submeteu-se à classificação, através de análise numérica de suas relações taxonómicas, 43 culturas representativas da população de bactérias acéticas isoladas da polpa de amostras de cacau colhidos durante fermentações naturais em cochos. Descreveu-se 9 grupos, dois dos quais se associam a espécies de *Acetobacter aceti* e *Gluconobacter oxydans*, subsp. *suboxydans*. Análise numérica revelou uma distância taxonómica maior entre algumas espécies do mesmo gênero *Acetobacter* e *Gluconobacter*. Sugere-se uma chave de caráter prático para identificar os grupos com base nos caracteres fenotípicos de interesse à tecnologia da fermentação do cacau.

Summary

Description and classification of acetic bacteria isolated from cacao fermentation based on the numerical analysis

The numerical analysis procedure was used to classify 43 cultures representing the population of acetic bacteria isolated from pulp of cacao bean samples, collected from sweat-boxes during normal fermentation tests. From nine groups described two were associated to *Acetobacter aceti* and *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans*. The numerical analysis revealed that greater taxonomic distance exists among some species within the *Acetobacter* group than between the two groups *Acetobacter* and *Gluconobacter*. It is suggested a practical key to identify groups, based on phenotypic similarities of interest to cacao fermentation technology.

Introdução

Do ponto de vista microbiológico a fermentação do cacau resume-se na atividade metabólica de bactérias láticas e leveduras sobre os açúcares da polpa que envolve as sementes, liberando ácidos e etanol e na atividade de bactérias acéticas sobre o etanol, oxidando-o a ácido acético e eventualmente CO₂ e água. As experiências científicas e práticas (15, 18) têm revelado que essa atividade microbiana é útil ao desenvolvimento do sabor do chocolate. As bactérias acéticas são atribuídos o calor e a acidez responsáveis pela morte das sementes, difusão e hidrólise de proteínas no cotilédones, fenômenos que irão refletir na qualidade do produto final (15).

A importância prática dos microrganismos na fermentação do cacau tem provocado nos últimos anos um estudo aprofundado sobre eles (2, 7, 16, 21). A descrição e classificação das bactérias acéticas isoladas do processo é importante tanto para auxiliar a busca de novas alternativas à fermentação do cacau, quanto para acompanhar as experiências práticas neste campo.

Em experiências anteriores (21), sobre identificação de bactérias lácticas na fermentação do cacau, grande número de culturas mostrou-se atípico quando estudado à luz das descrições de espécies, isoladas de outros meios naturais. Isto reflete talvez a influência dos componentes particulares do ecossistema, sobre a seleção e tipos de organismos encontrados somente nele. A ausência de caracteres próprios à fermentação de cacau dentro dos sistemas de classificação pré-existentes, dificulta o reconhecimento das espécies.

A taxonomia numérica fornece uma solução lógica a estas dificuldades. Ela permite agrupar espécies similares sem o compromisso de nomear os taxons, evitando-se o equívoco de se considerar novas espécies ou de se atribuir uma identidade típica, a uma espécie, mesmo comprovando seu caráter atípico (10).

Com base na determinação de grande número de caracteres sem hierarquia, a taxonomia numérica permite ainda definir os caracteres fenotípicos mais representativos e sugere uma chave taxonômica específica para o ecossistema em estudo, com a introdução de critérios de interesse à tecnologia da fermentação do cacau.

Material e Métodos

Utilizando de técnicas computacionais analisou-se numericamente os dados de 52 testes morfo-fisiológicos aplicados a 43 isolados de bactérias acéticas da fermentação do cacau, ao lado de quatro espécies de identidades conhecidas: *Acetobacter peroxydans* B-1044; *Acetobacter aceti* subsp. *aceti*, B-1036; *Acetobacter pasteurianus* B-65 e *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* B-72, cedidas pela "Culture Collection Research" - Northern Utilization Research Center - USDA (Illinois, USA).

Os procedimentos de amostragem e os meios de cultura utilizados na enumeração e isolamento foram descritos anteriormente (21). Considerou-se como bactéria acética todo isolado de forma bastonete, gram negativo, capaz de oxidar álcool para ácido acético (4, 5, 13, 14, 22).

Os isolados foram cultivados em ágar PELG inclinado (Peptona, 5%; extrato de levadura, 2%; glicose, 1%), mantidos a 4°C e repicados em Caldo Casoy (Merck, 5459) de onde se obteve inóculos para os testes taxonómicos.

Procedeu-se a aplicação dos seguintes testes morfo-fisiológicos: crescimento e reação no meio seletivo DSM (8), para isolar e diferenciar *Gluconobacter* e *Acetobacter*; coloração e tipo de colônia em placas com ágar PELG (cremosa, opaca e translúcida); formação de película em meio líquido (película ou turvo); tipo de crescimento em ágar PELG inclinado (filiforme e outros) foram de célula no meio PELG (bastonete espesso curto ou bastonete fino). Reação Gram; presença de catalase, motilidade, oxidação de etanol para ácido acético e oxidação de ácido acético para CO₂ e H₂O, seguindo várias metodologias (5, 13, 20, 24); crescimento em caldo PELG, com 3, 4, 5, 7 e 10% de etanol; crescimento em meio tamponado de pH 2,5; 3,5; 4,5; 6,5; 7,5; e 8,0; crescimento a 15, 25, 35, 40 e 50°C, em caldo PELG; produção de pigmento; assimilação de lactato, cetogênese em glicerol, crescimento em etanol como única fonte de carbono, produção de celulose, formação de gluconato e utilização de citrato conforme metodologias sugeridas (5, 6, 20). Produção de ácido de glicose, arabinose, D-galactose, D-manoze, D-Xilose, celobiose, manitol, maltose, sacarose, ribose, lactose, frutose, trealose, dulcitol no meio de cultura proposto por Green & Gray (17) e crescimento em presença de KCN (1).

As respostas aos testes, em sua maioria, puderam ser interpretadas, com um dos escores: 1 ou 0, conforme presença ou ausência de característica analisada. Alguns testes deram respostas intermediárias, como assimilação de lactato, onde observou-se além de assimilação negativa e assimilação positiva, uma assimilação incompleta. Outros testes deram respostas variadas, como aparência de colônia, interpretada como cremosa opaca ou translúcida. Nestes casos foram introduzidos outros escores.

A partir dos escores, foi calculado um coeficiente de similaridade para cada par de bactérias, por meio da expressão:

$$S = \frac{N_S}{N_S + N_d}$$

onde N_S é o número de escores iguais, ou seja o número de características similares às duas bactérias e N_d o número de característica em que o par de bactérias diferem, ou seja número de escores desiguais. O cálculo das similaridades entre as 47 bactérias foi efetuado com o auxílio do computador, por meio de um programa Fortran, à parte.

Os coeficientes de similaridade, tabulados na forma de uma matriz foram submetidos à análise de Cluster pelo método de ligação simples (25), proposto na classificação de *Streptococci* (9) na taxonomia de lactobacilli isolados do vinho (3). O programa extraído de Orlóci (19) efetua as seguintes etapas: 1) A partir da matriz de similaridade identifica-se os elementos de maior similaridade e reuni-los em grupos; 2) Os vetores correspondentes aos elementos do agrupamento são então substituídos por um vetor médio; 3) Calcula-se nova matriz de similaridade e identifica-se os elementos do agrupamento mais próximo (de maior similaridade), compondo-se novo agrupamento.

Este procedimento foi repetido até que todas as bactérias fossem agrupadas em um grande grupo.

O cálculo das novas similaridades, entre o grupo formado e os demais elementos da matriz é definido a partir da média simples:

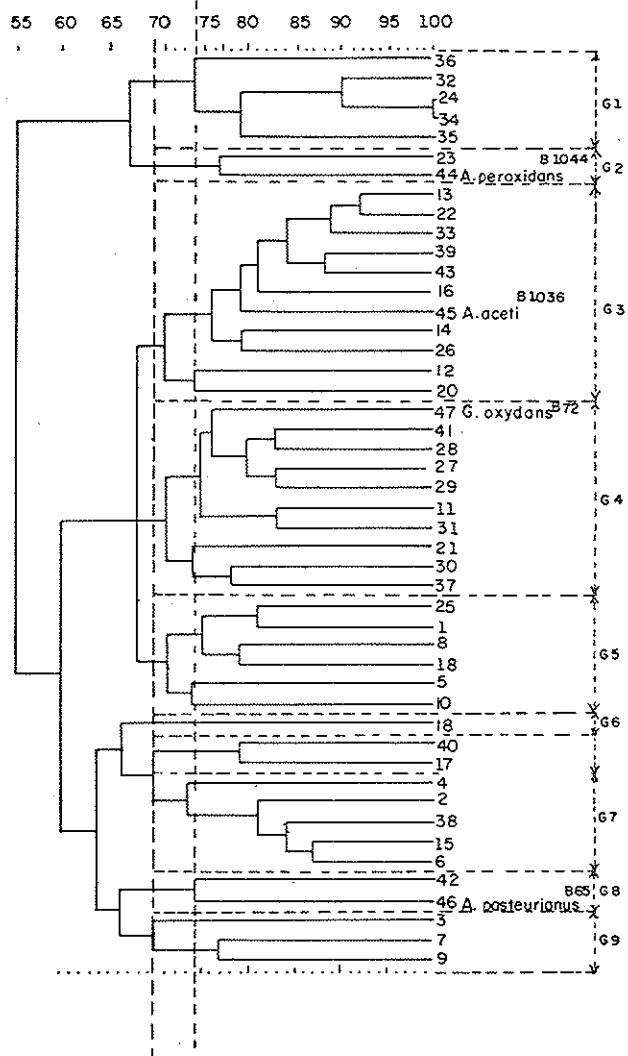
$$Sr(ii) = \frac{n_i}{n_i + n_j} Sri + \frac{n_j}{n_i + n_j} Srj$$

onde n é o número de elementos que forma o grupo, Sri e Srj as similaridades anteriores com cada elemento da matriz.

Resultados e Discussão

A escolha do nível de similaridade e a definição dos grupos - As bactérias submetidas à análise numérica foram a priori identificadas como bactérias acéticas em vista de seu potencial em produzir ácido de etanol (5, 20, 22, 23).

Figura 1 - Dendograma dos "clusters" de bactérias acéticas obtido pelo método de ligação simples



Os resultados estão sumarizados na forma de um dendograma (Figura 1) que mostra os grupos formados pelo método de ligação simples.

Entre as 52 cepas analisadas, poucas foram as que revelaram 90 ou 85% de semelhança entre si. A escolha desses níveis para classificação, implicaria portanto em nomear 40 espécies, aproximadamente, o que não é aconselhável (1), além de ser um número grande para ser considerado nas bactérias que, apesar de isoladas de um ambiente natural, característico, guarda uma relação estrita com espécies existentes, e portanto não devem ser consideradas como novas espécies. O nível de 0,75 de similaridade distingue os gêneros clássicos das bactérias acéticas, entre os quais algumas espécies de identidade conhecidas estão presentes como testemunhas. Este é também um nível em que as principais características de interesse à microbiologia da fermentação de cacau são distintas nos grupos mais representativos (aqueles que englobam maior número de cepas) e são homogêneas, dentro desses grupos. Entretanto, forma-se neste nível, o total de 20 grupos, muitos dos quais inexpressivos, a princípio à fermentação de cacau, devido à sua heterogeneidade nas características de interesse àquele processo. A escolha do nível 0,70, portanto, justifica-se porque reduz para nove o total de grupos, mantendo-se os grupos representativos de 0,75, inclusive com as espécies testemunhas em grupos distintos, apenas ligando cepas individuais ou grupos constituídos de duas ou três cepas, a grupos maiores.

Características numéricas dos grupos formados ao nível de 0,70 de similaridade são apresentadas na Tabela 1.

Figura 2 - Chave taxonômica simplificada sugerida para classificação de bactérias acéticas da fermentação de cacau

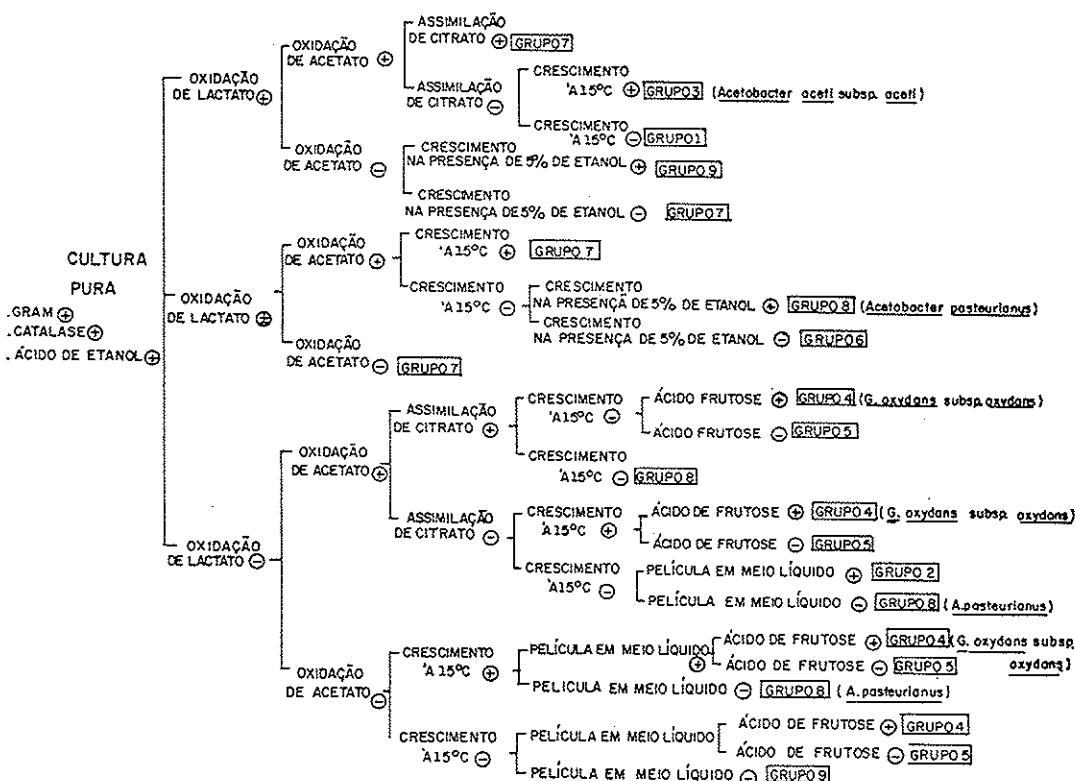


Tabela 1 - Características numéricas dos grupos formados ao nível de 0,70 de similaridade.

Símbolos: \bar{S} = Média dos coeficientes de similaridade entre as cepas do grupo; σ = Desvio padrão da distribuição dos coeficientes de similaridade; R = Cepa do grupo cuja média do coeficiente de similaridade com outras cepas do grupo é a mais elevada; Si = Menor média do coeficiente de similaridade da cepa R com uma cepa de seu grupo

Caract. Grupo	Números de cepas	\bar{S}	σ	Si	R
1	5	81,4	9,37	77	24
2	2	-	-	-	-
3	11	77,11	6,75	71	13
4	10	74,87	4,97	72	41
5	6	73,53	4,00	72	1
6	1	-	-	-	-
7	7	74,62	6,66	68	15
8	2	-	-	-	-
9	3	72,33	4,04	70	7/9

Principais características fenotípicas - Dentre as características observadas no grupo das bactérias acéticas isoladas da fermentação do cacau, algumas são comuns a todas as cepas. Por exemplo, mobilidade positiva, ausência de produção de celulose, cetogênese de glicerol, crescimento a pH 5,0, crescimento em presença de 4% de etanol e crescimento a 45°C, esse último, sendo um caráter atípico, não manifestado pelas espécies testemunhas, mas justificado em vista do ambiente natural (cacau em fermentação), apresentar temperaturas elevadas, por volta de 50°C, durante fase considerável do processo (21). Inclusive, o calor gerado durante a fermentação de cacau, é resultado da intensa atividade oxidativa desse grupo de bactérias (15). Com raras exceções as cepas revelaram-se também capazes de crescer a 50°C, pH 3,5 e 5,0% de etanol. As cepas 39 (FBA 8x), 29 (FSA 124i) e 5 (FBL 8s) reunem duas propriedades importantes no ecossistema polpa de cacau em fermentação, que são o crescimento a 10% de etanol e pH 3,5 já foram observadas concentrações de 10 a 25% de etanol nos períodos iniciais da fermentação da polpa de cacau (18) e pH inicial aproximadamente 3,5 (15). As cepas 33 (FSA 8e) e 1 (FBL 0d) também resistiram à concentração de 10% de etanol e ainda cresceram em pH 2,5.

A atividade de oxidação de etanol para acetato foi maior nas cepas isoladas da fermentação de cacau do que nas espécies de identidade conhecidas já citadas, submetidas aos testes como testemunhas. A oxidação de etanol para ácido acético foi testada pelo método de Carr (5) e Passmore (20), onde a presença desse ácido no meio é evidente pela mudança do indicador, verde bromo cresol, e confirmada pela formação de um halo transporte em volta da colônia crescendo sob ágar com extrato de levedura, CaCO_3 e etanol. No teste confirmatório certo número de cepas mostrou pouca evidência da produção de ácido, particularmente cepas incluídas no grupo 4 e 1.

Cepas incluídas, principalmente, no grupo 3, cresceram utilizando lactato. Outras foram capazes de assimilar parcialmente o lactato, oxidando-o a outro ácido provavelmente acetato (12).

Assimilação de citrato foi variável entre alguns isolados e negativa para a maioria deles. A não utilização de citrato não implica na ausência de enzimas intracelulares competentes para sua transformação, isto se deve aparente a problema de permeabilidade (1).

Crescimento de alguns isolados na presença de cianeto, demonstra a ausência de citocromo em suas cadeias respiratórias. Em algumas bactérias acéticas a respiração se procede através de um pigmento proto-hemin, ligado a CO, que é também uma enzima que transfere oxigênio (22).

Caracterização dos grupos - **Grupo 1** - Compreende as cepas 36 (FBL 52p), 24 (FBA 112x), 32 (FSA 88a), 34 (FSA 112x) e 35 (FSA 148l). Possuem média de semelhança boa 81,4, mas o grupo é muito heterogêneo ($\sigma = 9,37$).

O grupo 1 pode ser definido como bactérias acéticas que reagem positivamente no ágar DSM (8), revelando-se pertencer ao gênero *Acetobacter*. Oxida etanol, acetato e lactato a CO_2 e H_2O . Não assimila citrato, não cresce num meio contendo etanol como única fonte de carbono. Não produzem ácido das monoses xilose, ribose ou frutose, nem dos dissacarídeos cellobiose, maltose e sacarose. Demonstram respostas variadas

sob diferentes níveis de pH e temperatura. Oxidação de glucose e ácido glucônico foi negativa para a maioria das espécies desse grupo.

Comparando as respostas do grupo à taxonomia clássica, excetuando-se aetogênese de glicerol, todos os demais testes o associam a subespécie *A. pasteurianus* subsp. *ascendens* (13) também descrita (10), como *Acetobacter ascendens* (10).

Grupo 2 - Constituído por duas cepas, uma das quais isoladas da fermentação do cacau (23-FBA 88f) e a outra *Acetobacter peroxydans* B-1044. Elas se associam ao nível de 0,77 e somente se ligam ao grupo anterior num nível de 0,55 de similaridade. Isso prova que se trata de uma cepa bem distinta das demais, cujas características estudadas aproximam-na de *A. peroxydans*. Essa espécie apresentou, em nosso laboratório, duas características incomuns às suas especificações (13): catalase positiva e não oxidação de lactato total ou parcialmente. Ambas cepas, capazes de oxidar acetato, mas não lactato, também não utilizaram citrato exógeno, foram incapazes de crescer a 15°C mas cresceram a 40, 45 e 50°C.

Grupo 3 - É o grupo que engloba o maior número de cepas, relacionado a *Acetobacter aceti* B-1036. Aparentemente, trata-se de um grupo de espécies típicas cujas propriedades o identifica com *Acetobacter aceti*, descrita na literatura: capaz de oxidar etanol, acetato e lactato para CO₂ e H₂O, carbono, apresentar cetogênese de glicerol e ausência de pigmento.

Outras propriedades, entretanto, foram redundantes, daí a baixa homogeneidade do grupo ($\sigma = 6,75$). O grupo possui uma similaridade média de 77,11.

Uma análise de grupo 3, em vista do grande número de isolados a ele associados, significa uma análise das bactérias acéticas mais frequentemente encontradas na fermentação do cacau.

O metabolismo de carbohidratos nessas bactérias ocorre via Entner-Doudoroff, com a participação de uma 6-P-glucose desidrogenase e 2-ceto 3-desoxi-6-P-gluconato aldolase que libera gliceraldeído-3-P e ácido pirúvico. O acetato, produzido por *A. aceti*, é um intermediário do piruvato e é formado independentemente de ácido lipídico. A oxidação de acetato ocorre via ciclo Ácido Tri Carboxílico. O sistema de transporte de elétrons é ativo, por isso, a oxidação do substrato como etanol ocorre tão rapidamente (13, 22).

O gênero *Acetobacter* foi classificado como sendo bactéria lacotofílica (4), em vista de sua atividade fisiológica ser sensivelmente aumentada quando lactato está presente no meio. Ácido lático é subproduto do metabolismo de bactérias lácticas na fermentação do cacau (7), sua presença no sistema é portanto, um fator ecológico que favorece a atividade de bactérias acéticas no processo.

A. aceti oxida substâncias que são intermediárias no metabolismo de lactato através do piruvato de Ciclo do Ácido Tricarboxílico, por meio de um sistema enzimático indutível, enquanto a oxidação de etanol e acetaldeído é conduzida por um sistema de enzimas constitutivas (11).

Esse organismo foi classificado como capaz de oxidar glicose somente para ácido glucônico, não efetuam glicólise (10). Da glicose presente no meio, 15% é utilizado como fonte de carbono e energia e 80% oxidado para ácido glucônico (11).

Esse grupo caracteriza-se ainda por resistir às condições de fermentação intensa para continuar a crescer, após a fermentação se completar e por ser pouco exigente, nutricionalmente; não requerem suprimento de fatores de crescimento exógeno e sintetizam proteínas, quando a incubação é feita em soluções de prolina, glutamato e aspartato (22).

Grupo 4 - Compreende nove cepas de bactérias acéticas, associadas, pela análise numérica, a *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans*. Apresenta a média de similaridade de 74,8% e desvio padrão 4,97. Possui algumas características típicas do gênero (14), como ausência de oxidação de lactato e acetato. Algumas cepas, entretanto, contrariando a identidade do gênero, oxidaram completamente o etanol e cresceram sob etanol, como única fonte de carbono. Respostas inconsistentes, apresentadas por bactérias do gênero *Gluconobacter*, já foram também mencionadas (5, 10, 20). *Gluconobacter* atípicas, presentes na fermentação do cacau, podem ser resultantes de adaptação evolutiva de espécies típicas ou espécies representativas dos ancestrais de alguma *Acetobacter*.

As bactérias acéticas que compõem esse grupo foram referidas como oxidantes incompletos (15, 20, 22) ou espécies glicofílicas (4). Os resultados indicaram que não houve produção de ácido de arabinose, galactose (exceto duas cepas) e lactose, as demais pentoses, hexoses e dissacarídeos testados foram oxidados a seus ácidos correspondentes.

O grupo revelou capacidade para crescer uma ampla faixa de temperatura de 5 a 50°C. A atividade a diferentes níveis de pH foi variada. Todas as cepas foram positivas para a cetogênese de glicerol e cresceram em presença de KCN. Isso concorda com Ragavendra Rao (22) quando refere-se à ausência de citrocromo tipo a na *Acetobacter suboxydans*, hoje *Gluconobacter oxydans* subsp. *suboxydans* (14).

Nenhuma das cepas desse grupo mostrou pigmento de glicose, exceto a cepa 27-FSA 76b, inclusiva a testemunha *G. oxydans* subsp. *suboxydans* B-72. Sonente algumas espécies produzem pigmento marron de glucose, mas podem produzir de frutose e em menor extensão de sacarose e maltose (5, 20).

Foi reconhecido em algumas espécies a via da Hexose Mono Fosfato (10).

Esse grupo corresponde ao grupo *suboxydans* de Frateur, que De Ley & Schell (11) denominaram *Acetomonas oxydans*.

Grupo 5 - É formado por seis cepas, com média de similaridade entre si de 73,53. É o mais homogêneo dos grupos ($\sigma = 4,0$) e desperta a atenção porque, pelo quadro de respostas, ao nível de 0,70 de similaridade, ele se confunde com o anterior. Difícil notar um teste que o separa definitivamente daquele. Isso porque, em alguns testes, como oxidação de açúcares, por exemplo, o grupo 5 apresenta algumas respostas negativas, enquanto a resposta a esses testes não é sempre positiva para todas as cepas do grupo 4.

A análise numérica, enquanto, separa-os ao nível de 0,70 e reúne-os a 0,68, assim como reúne-os (grupos 4 e 5) também ao Grupo 3.

É possível que esse grupo se enquadre em alguma das quatro espécies de *Gluconobacter oxydans* (14), requerendo algum teste especial para identificá-las.

Grupo 6 - Formado unicamente pela cepa 19-FBL 64d, que se liga ao grupo 7 ao nível de 0,66. Caracteriza-se por oxidar acetato completamente, mas não lactato. Cresce a temperaturas mais elevadas, 35, 40, 45 e 50°C, e falha no crescimento a 15 e 25°C. Cresce, embora fracamente, sob etanol no meio "Hoyer", utiliza e resiste a 4% de etanol.

Grupo 7 - É formado por sete cepas, cuja semelhança média entre si é 74,62, com coeficiente de similaridade disperso (6,66). Este grupo, não está associado a nenhuma das espécies testemunhas, mas corresponde, em alguns pontos, à descrição de *Acetobacter aceti*, como oxidação de etanol, acetato e lactato, cetogênese de glicerol, crescimento sob etanol, ácido de glicose e crescimento em pH 4,5. Algumas cepas demonstraram apenas a oxidação parcial do lactato. Todas as cepas não resistiram à concentração de etanol superior a 4%, mas cresceram, com raras exceções, numa ampla faixa de temperatura. O fato de que algumas cepas produzem pigmento aproxima esse grupo a *A. aceti* subsp. *liquefaciens* (13).

Grupo 8 - Composto de duas cepas: 42-FSA 124a e a cepa *A. pasteurianus* B-65. Certo número de características desse grupo o distingue do anterior, ao qual se ligaria somente num nível de 0,63. A resposta para cetogênese de glicerol, no isolado em estudo, diferiu de *A. pasteurianus* B-65. A fermentação dos açúcares como maltose, sacarose e frutose é positiva para ambos, embora esses resultados não sejam descritos para a espécie (13).

Grupo 9 - Constituído por três cepas. A análise numérica estudada separa essas de qualquer das espécies conhecidas de *Acetobacter* e *Gluconobacter* e presentes no estudo. Parece difícil mesmo incluí-la num dos gêneros, à luz da taxonomia clássica, já que as características básicas desse sistema são variáveis dentro do grupo, como oxidação de acetato e lactato. Possuem semelhança média de 72,33 e desvio = 4,04. Esse grupo liga-se ao grupo 8, ao nível de 0,66 e ao grupo 7, ao nível de 0,63.

Ao nível de 0,60, distinguem-se dois grupos de bactérias acéticas: um que confunde *Acetobacter* e *Gluconobacter* e outro associado unicamente a *A. peroxydans*.

De Ley (10) aconselhou considerar o grupo de bactérias acéticas como constituição de dois biotipos: *Acetobacter aceti* e *Gluconobacter oxydans* as linhas filogenéticas como variação de uma espécie. É evidente no dendograma, entretanto, que é impossível distinguir somente esses dois biotipos. *Acetobacter aceti* B-1036 e *Gluconobacter oxydans* B-65 são reunidas a um nível de similaridade superior àquele que reúne as três espécies do gênero *Acetobacter*: *A. aceti*, *A. peroxydans* e *A. pasteurianus*. Isto sublinha uma distância taxonômica maior, separando espécies do gênero *Acetobacter*, do que separando o gênero *Acetobacter* do *Gluconobacter*. Esta distância foi também verificada entre *A. xylinum* e *A. peroxydans* (10).

Os testes, sugeridos numa chave taxonómica clássica (13, 14) não permitem uma separação nítida das espécies, uma vez que as respostas de alguns isolados a esses testes foram inconsistentes. No grupo 3, representado por *Acetobacter aceti*, a característica oxidação de acetato, por exemplo, é insuficiente para separá-lo do grupo representado por *Gluconobacter oxydans*, já que algumas cepas desse último deram respostas positivas, no teste.

A classificação numérica permite julgar o valor taxonómico dos caracteres fenotípicos das bactérias acéticas de interesse do processo de fermentação de cacau. A oxidação de acetato e lactato indica a possibilidade de algumas bactérias acéticas consumirem esses ácidos, produzidos durante a fermentação, pela atividade desses ou de outros microrganismos (7, 15). Assimilação de citrato, característica do grupo 7, embora possa ocorrer em outros grupos é interessante, tendo em vista que esse é o ácido naturalmente encontrado na polpa das sementes de cacau (15). Assim, também é interessante a produção de ácido de frutose, um componente que representa por volta de 50% dos açúcares naturais da polpa (dado não publicado).

A Figura 2 mostra uma chave de caráter prático, simplificada, com testes de interesse à fermentação de cacau, sugerida pela análise numérica dos dados. Apenas o grupo 5 pode, eventualmente, se confundir com o grupo 4, pois alguns testes são variados dentre e entre esses grupos. Essa chave poderá ser útil no acompanhamento dos estudos, em busca de novas tecnologias para fermentação de cacau e oferece subsídios à manipulação de algumas cepas, no sentido de se controlar o processo, para melhorar a qualidade das sementes fermentadas.

Análise numérica das bactérias acéticas sugere ainda a utilização das cepas 29 (FSA 124i) e 5 (FBL 8s), capazes de crescerem na presença de 10% de etanol, na produção de vinagre do suco extraído da polpa de cacau.

Agradecimentos

Os autores são gratos a Silvéria Santos Conceição, pelo auxílio nos testes bioquímicos, a Gilberto Nicolella, pelo apoio estatístico e a Eduardo R. Maron, pela tradução do programa Basic e Fortran.

Referências Bibliográficas

1. Amaral, D.; Costa, S.O.P.; Schwab, A.; Oliveira, E.N.S. de; Branco, C.L.; Cury, A. & Travassos, L.R. - Experimentos de microbiologia geral. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 1967.
2. Balasimba, D.; Bhat, N.T. & Boparah, M. - Comparative chemistry and microbiology of cocoa fermentation in India. Journal of Plantation Crops, 11:55-59, 1983.
3. Barre, O. - Taxonomie numérique de lactobacilles isolés du vin. Arch. Mikrobiol., 68:74-86, 1969.
4. Brown, G.D. & Rainbow, C. - Nutritional patterns in acetic acid bacteria. J. Gen. Microbiol., 15:61-69, 1956.
5. Carr, J.G. - Identification of acetic acid bacteria. In: - Gibbs, B.M. & Shaplon, D.D., eds. - Identification methods for microbiologists. London, Academic Press, Part 3, 1968.

6. Carr, J.G. - Tetrads-forming cocci in ciders. *J. Applied Bacteriol.*, 33:371-379, 1970.
7. Carr, J.C.; Davis, P.A. & Dougan, J. - Cocoa fermentation in Ghana and Malaysia. In: - 7th International Cocoa Research Conference Douala Cameroun. Novembre, 1979. Hetford, Stephen Austin and Sons, p.573-576, 1981.
8. Cirigliano, M.C. - A selective medium for the isolation and differentiation of *Gluconobacter* and *Acetobacter*. *J. Food Sci.*, 47:1038-1039, 1982.
9. Colman, G. - The application of computers to the classification of *Streptococci*. *J. Gen. Microbiol.*, 50:149-159, 1968.
10. De Ley, J. - Comparative carbohydrate metabolism and a proposal for a phylogenetic relationship of the acetic acid bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 24:31-50, 1961
11. De Ley, J. & Schell, J. - Oxidation of several substrates by *Acetobacter aceti*. *J. Bacteriol.*, 77:445-451, 1951.
12. De Ley, J. & Schell, J. - Studies on the metabolism of *Acetobacter peroxydans*. II - The enzymic mechanism of lactate metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*, 35:154-165, 1959.
13. De Ley, J. & Frateur, J.-Genus *Acetobacter*. In: - Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, The Williams and Wilkins, p.276-278, 1974.
14. De Ley, J. & Frateur, J. - Genus IV. *Gluconobacter*. In: - Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, The Williams and Wilkins, p.251-253, 1974.
15. Forsyth, W.G.C. & Quesnel, V.C. - The mechanism of cacao curing. *Advances in Enzymology*, 25:457-491, 1963.
16. Gauthier, B.; Guiraud, J.; Vincent, J.C., Parvais, J.R. & Galzy, P. - Remarques sur la flore des levures de la fermentation traditionnelle du cacao en Côte D'Ivoire. *Revue de Fermentation et des Industries Alimentaires*, 32:160-163, 1977.
17. Green, S.R. & Gray, P.P. - Differential procedure applicable to bacteriological investigation in Brewing. *Wallerstein Labs Commun.*, 13:357-366, 1950.
18. Lopez, A.S. & Quesnel, V.C. - Production of ethanol and acetic acid during fermentation. Annual Report on Cacao Research (Trinidad), 1973, p.39-50, 1974.
19. Orlóci, L. - Multivariate analysis in vegetation research. Netherlands, W. Junk B.V. Publishers, Pasmans the Hague, 1975.
20. Passmore, S.M. & Carr, J.G. - The ecology of acetic acid bacteria with particular reference to cider manufacture. *J. Applied Bacteriol.*, 38:151-158, 1975.
21. Passos, F.M.L.; Silva, D.O.; Lopez, A.; Ferreira, C.L.L.F. & Guimarães, W.V. - Characterization and distribution of the lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentation in Bahia. *J. Food Sci.*, 49:205-208, 1984.
22. Raghavendra Rao, M.R. - Acetic acid bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 11:317-338, 1957.
23. Shimwell, J.L.; Carr, J.G. & Rhodes, M.E. - Differentiation of *Acetomonas* and *Pseudomonas*. *J. Gen. Microbiol.*, 23:283-286, 1960.
24. Skeman, V.B.O. - A guide to the identification of the genera of bacteria. Baltimore, Williams & Wilkins, 1959.

EFEITO DA TEMPERATURA, pH, TEMPO DE CULTIVO E NUTRIENTES NO CRESCIMENTO DE FUNGOS IMPERFEITOS EM VINHAÇA

Pedro Luiz Rosalem
 Sânia Maria Tauk
 & Maria Cristina Nunes dos Santos
 Deptº de Ecologia
 Instituto de Biociências UNESP
 Caixa Postal 178
 13500 Rio Claro SP, Brasil

Resumo

Estudo do crescimento de quatro culturas de fungos *Acremonium fusidioides*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*, isolados de solo sob cerrado tratado com vinhaça, foi realizado em meios de vinhaça de caldo misto de cana-de-açúcar pasteurizados. Determinou-se as curvas de crescimento dos microrganismos quanto a temperatura, tempo de cultivo, pH e concentrações de nutrientes. O fungo que demonstrou maior produção de biomassa em vinhaça foi o *Acremonium fusidioides*, em 60 horas de cultivo, a 32,5°C, pH do meio 4,5, agitação constante de 250rpm e relação de C:N:P de 20:1:0,1.

Summary

Effect of temperature, pH, time of cultivation and nutrients on the production of fungi imperfecti in distillery slops (vinasse)

The growth of four species of fungi, isolated from "cerrado" soil previously treated with vinasse, was observed in pasteurized distillery slops of sugar cane. It was observed the growth rate of these microorganisms in different temperature, pH, time of cultivation and nutrient concentration. The species *Acremonium fusidioides* showed the greatest biomass production in vinasse, during 60h of cultivation, at 32,5°C, medium pH of 4.5, 250rpm and C:N:P ratio of 20:1:0.1.

Introdução

Um grande número de leveduras, bactérias, outros fungos e algas, têm sido estudados visando a produção de proteína microbiana em vinhaça (1, 7, 10, 11, 12), entretanto nem sempre com tempo de geração, conteúdo proteíco, qualidade de proteína e depuração do resíduo satisfatórios.

Estudando o efeito da adição de vinhaça no solo sob cerrado, verificou-se que a flora fungica sofre um grande aumento (4). Decorrente desta constatação, os fungos foram identificados e mantidos em laboratório para estudos posteriores sobre o crescimento desses microrganismos em vinhaça.

Os fungos filamentosos crescem menos rapidamente que as leveduras, porém podem ser cultivados em meios não assépticos e tem sido citado que possuem melhor composição de aminoácidos (5). Por isso tem sido vários os estudos sobre o desenvolvimento desses microrganismos em resíduos industriais (3, 6, 8).

Tabela 1 - Concentrações iniciais de C, N e P nos meios de vinhaça

	Prop.	g/l	Prop.	g/l	Prop.	g/l	Prop.	g/l	Prop.	g/l	Prop.	g/l
C	20	3,0	40	3,0	60	3,0	80	3,0	100	3,0		
N	1	0,15	1	0,075	1	0,05	1	0,0375	1	0,03		
P	0,1	0,015	0,1	0,0075	0,1	0,005	0,1	0,0037	0,1	0,003		

Tabela 2 - Composição química da vinhaça de caldo misto, safra 1983; Usina Santana, Município de Rio Claro, SP

Componentes	g/100 ml
Sólidos totais	3,50
Açúcares redutores	0,29
Açúcares totais	0,60
Nitrogênio (kjeldahl)	0,08
Fósforo total	0,03
Cinzas	1,30
pH	4,50

Este trabalho constitui a seleção de fungos que melhor se desenvolvem em vinhaça e na determinação de alguns fatores que contribuem para melhor crescimento desses microrganismos neste resíduo e ao mesmo tempo tentar obter a depuração da vinhaça.

Material e Métodos

Microrganismos - Foram utilizadas quatro culturas de fungos filamentosos, isolados de solo de cerrado previamente tratado com vinhaça e mantidas no Departamento de Ecologia/UNESP, em meio de Sabouraud a 4°C. As espécies fúngicas utilizadas foram *Acremonium fusidioides*, *Penicillium notatum*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*.

Análise da vinhaça - A vinhaça de caldo misto foi obtida na Usina Santana, situada no Município de Rio Claro, SP. Açúcares redutores e totais foram determinados no resíduo (9, 11). Os teores em sólidos totais, nitrogênio, proteína bruta e cinzas foram determinados segundo o AOAC (2). O pH foi medido em pH-metro Bauch-Lomb. Após os cultivos, foram determinados o pH final e o consumo de N do meio.

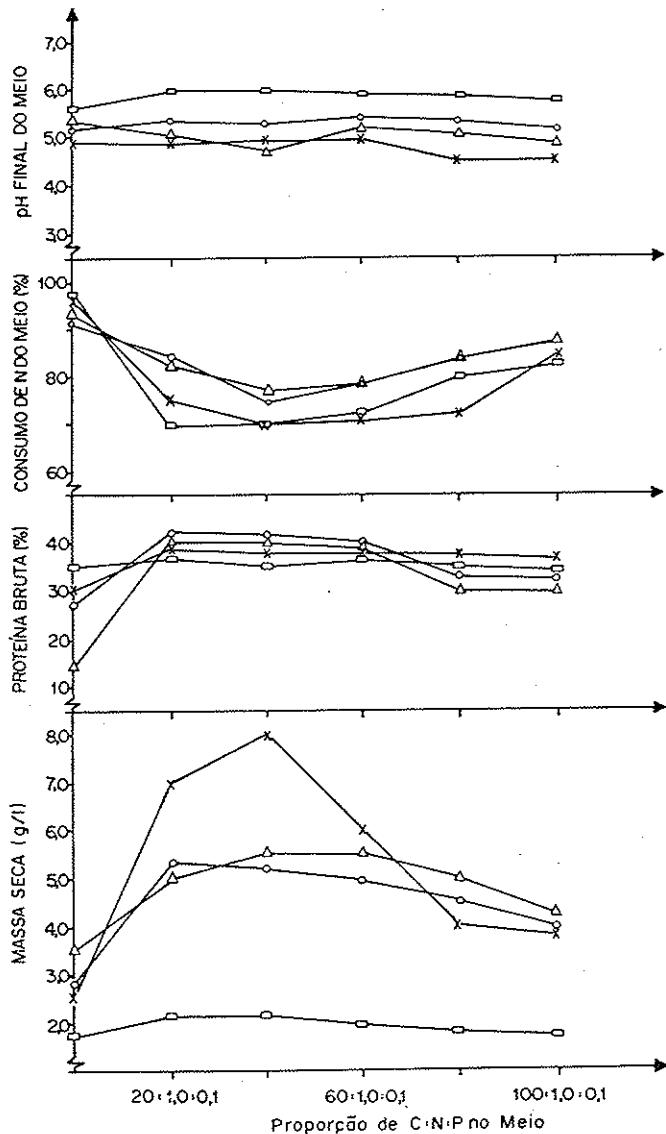
Inóculo - Da cultura preservada, foi realizada uma suspensão em solução salina e 10ml foram pipetados para erlenmeyer de 250ml contendo 50ml do meio com a mesma composição do meio utilizado no experimento respectivo. A seguir, incubado em mesa agitadora, por 48 horas a 30°C.

Curvas de crescimento - Utilizaram-se erlenmeyers de 500ml com 80ml de vinhaça. Agitação constante foi obtida com a mesa rotatória (250rpm). Os frascos receberam inóculo representando 20% do volume da cultura. A curva de crescimento foi determinada em diferentes pH: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5, sendo esses estabelecidos com NaOH ou HCl 1 N. Após a determinação do pH ótimo para cada microrganismo utilizado, determinou-se a curva de crescimento em relação à temperatura, para isto, os frascos foram mantidos agitados em sala com temperatura controlada.

Verificou-se o efeito da adição crescente de N e P na vinhaça, utilizando como fontes desses elementos, sulfato de amônia e ácido fosfórico, respectivamente. As concentrações utilizadas de C:N:P, foram 20:1:0,1; 40:1:0,1; 60:1:0,1; 80:1:0,1 e 100:1:0,1, sendo que a concentração de C na vinhaça foi constante (3g/l) em todos os experimentos. Foi realizado cultivo de microrganismos no mesmo meio, sob as mesmas condições ambientais, porém, sem acréscimo de nutrientes. Finalmente, a curva em relação ao tempo de cultivo, foi determinada para cada cultura de fungo, utilizando-se fatores ótimos de crescimento em vinhaça para cada microrganismo, determinados anteriormente.

Figura 1 - Efeito da concentração de nutrientes (C:N:P) no crescimento de alguns fungos filamentosos em vinhaça, 30°C e agitação constante de 250rpm.

Símbolos: X = *Acremonium fusidiooides*; □ = *Penicillium notatum*; Δ = *Aspergillus flavus*; o = *Aspergillus niger*

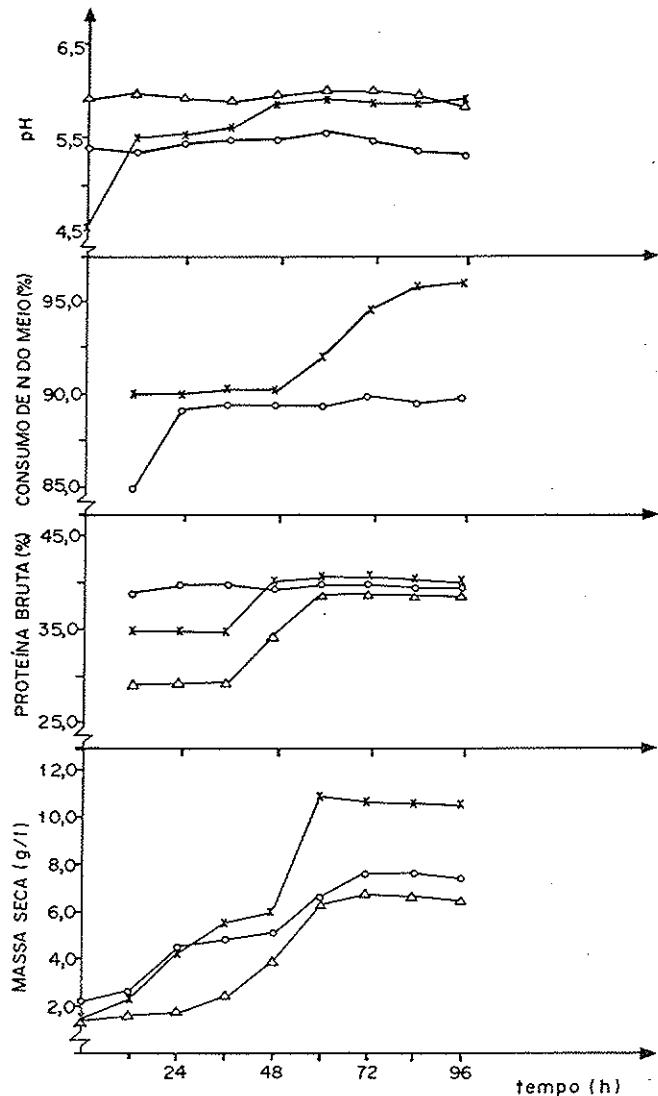


As concentrações iniciais de C, N e P nos meios de vinhaça utilizados constituiram nas proporções (prop.) citadas na Tabela 1.

Todos os meios contendo vinhaça foram pasteurizados a 85°C por 20 minutos e rapidamente resfriados até temperatura ambiente.

Composição química da biomassa - Foi caracterizada pela determinação dos teores de nitrogênio total, massa seca e cinza (2).

Figura 2 - Crescimento de *Acremonium fusidiooides* (-x-) *Aspergillus flavus* (-Δ-) e *Aspergillus niger* (-o-) em meio de vinhaça, agitação constante de 250rpm e respectivamente em: pH 4,5; 6,0; 5,5; a 32,5°C; 25,0°C; 30,0°C; proporções de C:N:P de 40:1:0,1; 40:1:0,1; 20:1:0,1



Resultados e Discussão

A Tabela 2 mostra os resultados das análises da vinhaça de caldo utilizada neste estudo.

Na Tabela 3 verifica-se o efeito do pH no desenvolvimento das culturas fúngicas em vinhaça, medindo esse fator através da produção de biomassa (massa seca g/l) e pelo teor protéico desta. Observa-se que para cada espécie estudada tem-se um ótimo de pH diferente. Nesse experimento a variação do consumo de N do meio é pequeno, podendo ser também verificado que a vinhaça, após o cultivo de *Acremonium fusidiooides*, sofreu uma descoloração, tornando-se amarelo claro.

Tabela 3 - Efeito do pH e temperatura no crescimento de alguns fungos filamentosos em vinhaça durante 60 horas, agitação constante de 250rpm.
 Símbolos: a = massa seca (g/l); b = proteína bruta (%); c = pH final do meio; d = consumo de N do meio (%)

Fatores ambientais de cultivo	<i>A. fusidiooides</i>				<i>P. notatum</i>				<i>A. flavus</i>				<i>A. niger</i>				
	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	a	b	c	d	
pH	3,5	2,0	33,0	3,5	95,0	0,2	21,0	3,5	93,0	0,7	25,0	3,2	95,0	1,5	22,5	3,8	97,0
	4,0	2,2	35,0	3,8	92,0	0,2	21,0	4,0	90,0	2,2	27,5	3,8	95,0	2,8	25,0	3,5	95,0
	4,5	2,8	36,0	9,0	95,0	0,2	22,0	4,2	92,5	2,2	27,5	3,8	94,0	3,0	37,0	3,5	95,0
	5,0	2,0	33,0	4,0	94,0	0,2	24,0	4,2	92,0	2,1	28,0	4,2	93,0	4,0	33,0	3,6	95,0
	5,5	1,8	35,0	4,1	92,5	0,3	30,0	4,2	92,5	4,0	30,0	4,5	94,0	5,5	42,0	4,0	96,0
	6,0	1,7	33,0	4,2	92,5	0,3	26,0	5,0	92,5	5,0	30,0	5,0	94,0	5,2	40,0	4,2	96,0
	6,5	1,7	32,0	4,3	93,0	0,5	40,0	5,0	93,0	1,9	20,0	5,2	95,0	5,0	35,0	4,0	92,0
	7,0	1,2	39,0	5,0	92,5	0,7	35,0	5,0	92,5	0,2	15,0	5,4	94,0	4,0	25,0	4,2	90,0
temperatura (°C)	7,5	-	-	-	1,0	36,0	5,5	92,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	25,0	1,8	35,0	4,8	82,0	1,0	28,0	4,6	82,0	4,6	24,0	5,0	82,0	3,0	30,0	4,8	86,0
	27,5	2,6	32,0	4,8	85,0	1,0	28,0	4,6	72,0	3,5	24,0	4,9	83,0	2,2	30,0	4,8	85,0
	30,0	3,5	32,0	4,8	85,0	1,8	26,0	4,5	78,0	3,5	20,0	4,6	82,0	4,2	32,0	4,8	86,0
	32,5	4,5	30,0	4,8	82,0	1,8	20,0	4,5	80,0	2,5	25,0	4,7	85,0	3,0	28,0	4,5	82,0
	35,0	2,5	30,0	4,8	82,0	2,8	20,0	5,0	80,0	2,0	28,0	4,6	84,0	1,8	25,0	4,5	82,0
	37,5	1,0	22,0	4,7	80,0	2,8	15,0	5,2	78,0	1,2	18,0	4,5	80,0	1,0	20,0	4,3	81,0

O efeito da adição de nutrientes em vinhaça pode ser observado mais nitidamente no cultivo de *Acremonium fusidiooides*, porque para os demais microrganismos esse efeito foi menor (Figura 1). Tal fato foi verificado também para o teor protéico encontrado na biomassa. Os pontos colocados sobre o eixo das ordenadas, são os resultados obtidos no meio onde não foram acrescidos nitrogênio e fósforo.

Não foram constatadas variações acentuadas do pH após os cultivos dos fungos e houve maior teor de proteína na biomassa do gênero *Aspergillus* em meios contendo maior concentração de N e P. Porém, independente desta concentração, os teores de proteínas da biomassa de *Penicillium notatum* e *Acremonium fusidiooides* foram praticamente constantes.

Estudos realizados com fungos filamentosos em suco de polpa de café demonstraram que ocorre o aumento no crescimento desses microrganismos, com acréscimo ao meio de sulfato de e amônia de ácido fosfórico (6).

Quanto ao ótimo de temperatura (Tabela 2) esse foi diferente para os microrganismos, alterando a produção de biomassa e o teor protéico dessa.

Verifica-se um crescimento reduzido de *Penicillium notatum* em vinhaça, sendo que nos diferentes tratamentos o valor máximo da concentração de biomassa foi cerca de 3g/l, muitas vezes sendo insuficiente para a caracterização química deste produto.

Comparando esses resultados com aqueles obtidos do desenvolvimento de fungos em suco de polpa de café (5), verifica-se que em vinhaça ocorre maior produção de massa fungica.

Na Figura 2 estão representados os resultados obtidos no crescimento dos fungos filamentosos em vinhaça, exceptuando *Penicillium notatum*, pela produção baixa de biomassa. Verifica-se que as condições ótimas para produção de *Acremonium fusidiooides* (11g/l) foram pH 4,5, 32,5°C, 60 horas, agitação constante de 250rpm e proporção C:N:P igual a 40:1:0,1. Nestas condições, o teor protéico da biomassa foi de 40%, porém o maior consumo de N se deu após 82 horas. Observa-se que o pH 6,0 contribuiu para maior obtenção de biomassa de *Aspergillus flavus* (6,8g/l) em vinhaça e a temperatura foi mais baixa (25°C) do que a utilizada para *Acremonium fusidiooides* e a proporção C:N:P foi 4:1:0,1. Para *Aspergillus niger* a maior produção de biomassa (7,8g/l) em vinhaça foi obtida em pH 5,5, 30°C, C:N:P igual a 20:1:0,1. Portanto, mesmo com a tentativa de optimização dos fatores ambientais de crescimento desses fungos em vinhaça, foi obtida maior produção de biomassa microbiana com *Acremonium fusidiooides* e nenhum sucesso pode ser obtido com *Penicillium notatum*.

O teor de proteína das biomassas destes fungos obtidas em diferentes condições foi próxima a 40%.

Será estudada no futuro, a optimização dos fatores para reduzir a taxa de crescimento máxima específica para as primeiras 12 horas, devido ao custo de se manter um sistema de condições controladas por 60 horas, principalmente, se o mesmo for utilizado em escala industrial e com fermentadores.

O problema da produção de hifas nos fermentadores pelos fungos imperfeitos foi discutida (7), sendo proposto um modelo de fermentador para solucionar esse problema quando os experimentos são desenvolvidos em escala piloto de produção.

Referências Bibliográficas

1. Angelis, D.F.; Kiyan, C.; Corso, C.R. & Tauk, S.M. - Emprego de leveduras em culturas puras e mistas objetivando o aproveitamento de vinhaça. *Brasil Açuc.*, 94:401-406, 1979.
2. AOAC - Association of Official Analytical Chemists. *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 12.ed. Washington, 1975.
3. Chruch, B.D.; Erikson, E.E. & Widmer, C.M. - Fungal digestion of food processing wastes. *Food Technol.*, 27:36-42, 1973.
4. Costa, S.M.G. da - Efeito da adição da vinhaça na microflora do solo de cerrado, da região de Corumbataí, SP. Rio Claro, Instituto de Biociências UNESP, 1984. (Dissertação de Tese de Mestrado).
5. León, R. de; Calzada, F.; Herrera, R. & Rolz, C. - Fungal biomass production from coffee pulp juice. *J. Ferment. Technol.*, 58:579-582, 1980.
6. Rolz, C. - Utilization of cane and coffee processing by-products as microbial protein substrates. In: - Tannenbaum, S. & Wany, D.I.C., eds. - *Single cell protein II*. Cambridge, The MIT Press, p.273-313, 1974.
7. Sheechan, G.J. & Greenfield, P.F. - Utilization treatment and disposal of distillery wastewater. *Water Res.*, 14:247-277, 1980.
8. Shukla, J.P. & Dutta, S.M. - Production of fungal protein from waste molasses. *Ind. J. Technol.*, 5:27-28, 1976.
9. Somogyi, M. - Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.*, 195:19-23, 1952.
10. Tauk, S.M. - Efeito da agitação, pH, tempo e nutrientes na produção de biomassa de *C. guilliermondii* em meios de vinhaça e melão. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 13:12-21, 1982.
11. Tauk, S.M. - Culture of *Candida* in vinasse and molasses: effect of acid and salt addition on biomass and rae protein production. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16:223-227, 1982.
12. Vanetti, M.C.D.; Silva, D.O. & Borges, A.C. - Crescimentos de bactérias do gênero *Bacillus* em vinhaça suplementada ou não com uréia e fosfato de sódio. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 14:233-238, 1983.

CRESCIMENTO DE CANDIDA UTILIS EM LICOR SULFÍTICO (LICOR NEGRO): EXPERIMENTO EM FERMENTADOR

Ernani Sebastião Sant'Anna

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

& Eugênio Aquarone

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

Resumo

Candida utilis cresceu sobre licor sulfítico (licor negro), em fermentador. Estabeleceu-se a adição intermitente de licor sulfítico concentrado (11,9% de ART) e a substituição parcial do substrato. O crescimento dos microrganismos é mais homogêneo, há substituição parcial do meio de crescimento. Neste caso, o rendimento foi de 54,94%, para o período de 172 horas de fermentação. A DBO₅ do meio esgotado é reduzida a 67,5%.

Summary

Candida utilis growth in spent sulfitic liquor: experiment in fermenter

Candida utilis has grown in spent sulfitic liquor (black liquor). An intermittent supply of concentrated spent sulfitic liquor was studied as well as the partial substrate substitution. Microorganisms grew homogenously in a partially substituted medium where yielding was 54.95% for a 172 hours fermentation period. The spent medium BOD is reduced to 67.5%.

Introdução

A possibilidade de obtenção e aplicação das leveduras, como alimento humano e para ração animal, remonta de muitos anos. Provavelmente, a primeira cogitação da conversão de açúcares da madeira para proteína foi na Alemanha. A idéia germinou rapidamente, durante a primeira guerra mundial, quando foi necessário procurar novas fontes de proteína, para suportar o bloqueio aliado. O processo foi ampliado para a escala comercial, durante a segunda guerra mundial.

Inicialmente, foi usado *Saccharomyces*, no processo. Como o "açúcar de madeira" é uma mistura de açúcares com cinco ou seis átomos de carbono e a levedura pode assimilar somente açúcares com seis átomos de carbono, outros microrganismos foram testados (3, 6, 8, 13). Ainda durante a segunda guerra mundial, devido às circunstâncias, apareceram, na Alemanha, as primeiras unidades industriais que se dedicaram, exclusivamente, à produção de leveduras para a alimentação humana. Em 1944, a pro-

dução de leveduras alimentícias naquele país era da ordem de 9000 toneladas/ano. Essas leveduras, para alimentação humana, foram produzidas a partir de açúcares existentes no licor sulfítico (4, 9). Também a Inglaterra instalou, na Jamaica, uma planta industrial, para produção de leveduras, a partir de resíduos de melão (5). Nos Estados Unidos, até 1942, a produção de leveduras ficou restrita ao desenvolvimento da tecnologia de leveduras para panificação; a partir de 1943, a atenção dos pesquisadores começou a se voltar para a produção de leveduras como alimento humano e animal.

No Brasil, pouquíssimo tem sido feito, para o aproveitamento de um importante resíduo como o licor sulfítico (licor negro). Na realidade, das muitas indústrias de celulose do Brasil, somente duas operam segundo o processo sulfítico, e encontram sérias dificuldades quanto ao destino do líquido. Mesmo que os açúcares existentes no licor não sejam aproveitados para fins comerciais, algum esforço deve ser feito, com o intuito de amenizar a carga poluente do licor, o qual, invariavelmente, acaba por poluir o local de descarga.

Material e Métodos

Candida utilis IZ-1840, utilizada no trabalho, foi cedida gentilmente pelo Instituto Zimotécnico, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. O microrganismo foi adaptado ao licor sulfítico, previamente tratado (12) e o inóculo preparado de forma a ter 65,0 a 80,0mg de células % (peso seco; 13). O experimento foi desenvolvido em um fermentador, equipado com controle de ar, temperatura, pH e agitação.

Os açúcares redutores totais (ART) foram determinados conforme Somogyi (14), o crescimento celular por método gravimétrico (2) e a demanda bioquímica de oxigênio (DBO) conforme a APHA (1).

O meio utilizado para o crescimento dos microrganismos foi o seguinte: licor sulfítico, uréia, fosfato dibásico de potássio e água de maceração de milho (AMM) na concentração de 2,5%.

Resultados e Discussão

Estudou-se a adição intermitente de licor sulfítico concentrado (11,9g de ART por 100g do licor) ao meio de crescimento (Tabela 1). À medida que é adicionado o licor concentrado, o rendimento diminui. Após as primeiras 10 horas de fermentação, o rendimento é de 56,7%. Entretanto, com 50 horas de fermentação, cai para 5,16%, quando o volume de concentrado adicionado foi de 105ml. A razão da queda em função do pequeno crescimento dos microrganismos, pode ser o aumento crescente da concentração de substâncias inibidoras, presentes no licor sulfítico, ou, remotamente, oriundas do próprio metabolismo dos microrganismos. Ainda existe a possibilidade da contaminação do meio, por outros microrganismos, embora esta hipótese seja pouco provável, em função das condições assépticas do fermentador e da provável inabilidade de outros microrganismos comuns, crescerem sobre o licor sulfítico.

Tabela 1 - Experimento em fermentador. Adição de licor sulfítico concentrado (11,9%) ao meio enriquecido com: uréia, 0,1%; fosfato dibásico de potássio, 0,05%; e AMM, 2,5%. Condições de trabalho: ar 2l/min; agitação 800rpm

Tempo (h)	Substrato adicionado (ml)	Volume total do meio (y) (ml)	Volume retira- do para amostra- gem (z) (ml)	y - z	Concentração de ART (%)	Concentração de células (ps) (mg%)	ART não fermentado (g %)	Porcentagem de leveduras pro- duzidas/ART consumido
0	-	800	-	-	1,08	70,0	-	-
10	80	880	15	865	1,03	585,4	0,05	56,7
18	85	950	15	935	1,15	1117,5	0,09	49,9
26	90	1025	15	1010	1,18	1645,5	0,14	50,5
34	95	1105	15	1090	1,21	2065,8	0,18	41,0
42	100	1175	15	1175	1,23	2331,1	0,23	26,5
50	105	1280	15	1265	1,27	2381,4	0,29	5,2

Tabela 2 - Experimento em fermentador. Renovação parcial do licor sulfítico contendo: ureia, 0,1%; fosfato dibásico de potássio, 0,05%; e AMM, 2,5%. Condições de trabalho: ar 2l/min; agitação 800rpm; tempo total 172 horas de fermentação; pH 4,5

Tempo (h)	Volume total de meio (ml)	Volume re- tirado (ml)	Volume adi- cionado (ml)	Concentração ART do volume retirado (g/l)	Concentração ART no meio (g/l)	Concentração de células (mg/l)	Leveduras pro- duzidas/ART con- sumido (%)
0	1200	-	-	-	1,020	69,7	-
20	1200	600	600	0,054	1,060	540,6	55,9
20	1200	600	600	0,066	1,041	528,8	53,2
24	1200	600	600	0,053	1,070	534,4	54,1
18	1200	600	600	0,059	1,020	565,8	56,0
24	1200	600	600	0,063	1,041	523,4	54,7
12	1200	600	650	0,058	1,063	543,1	55,3
12	1200	600	600	0,066	1,023	515,9	51,9
12	1200	600	600	0,073	1,066	536,6	56,5
12	1200	600	600	0,600	1,050	564,3	56,1
18	1200	600	632	0,055	1,079	544,9	54,8

No experimento, mostrado na Tabela 2, foi feita a remoção parcial do meio, ao término de cada período de fermentação, indicado pelo teor de açúcares redutores totais. A concentração inicial de ART no licor sulfítico foi de 1,02% e o rendimento médio de 54,94%, para 172 horas de fermentação. Neste sistema (substituição de 50% do meio) e durante aquele período de fermentação, nenhuma anormalidade foi observada e o rendimento, ao término de cada período, praticamente, manteve-se constante.

Um dos maiores problemas, acarretados pelo licor sulfítico, é o seu poder poluente, devido à quantidade de matéria orgânica em suspensão e em solução (10, 11, 15), inclusive ao teor de açúcares presentes. A eliminação destes açúcares pelos microrganismos, através de um processo fermentativo, provoca diminuição do poder poluente, representado pela diminuição da Demanda Bioquímica de Oxigênio (Tabela 2).

O licor sulfítico apresenta uma DBO_5 de 29.000mg/l. Com a operação comum de tratamento, ocorre redução de 18,6%, provavelmente devida à insolubilização e consequente precipitação de determinadas substâncias que são retiradas por centrifugação.

A utilização dos açúcares e de outras formas de carbono, presentes no licor sulfítico, por *C. utilis*, fez com que a DBO_5 tivesse uma redução de 67,5%, quando o mosto para o crescimento foi composto somente por licor sulfítico e nutrientes e de 66,2% quando, ao mosto, foi adicionado AMM, na proporção de 2,5%.

Inskeep & col. (7), estudando licor sulfítico, obtido a partir de abeto vermelho, encontraram DBO_5 , para o licor sem nenhum tratamento, de 35.000mg/l. Após a utilização das substâncias orgânicas, por *Torula*, a DBO_5 caiu para 8.750mg/l, o que representa uma redução de 75%.

Para cada tonelada de celulose produzida, são descarregados, aproximadamente, 7.000 litros de licor sulfítico (licor negro). É fácil imaginar, portanto, o volume poluente de uma fábrica de celulose de médio porte. Embora proibida, a descarga normalmente é efetuada em rios, de preferência turbulentos, para que possam oxigenar o máximo possível as águas, compensando o consumo de oxigênio pela flora microbiológica. A não ser que os rios sejam de grande porte e extremamente turbulentos, o que normalmente não ocorre, com o tempo a impregnação do licor sulfítico estende-se por longas extensões do leito, descaracterizando-o totalmente.

Entretanto, com a redução de 67,5% na DBO_5 , a possibilidade de manutenção e mesmo de recuperação das águas é maior. Desta forma, mesmo que o aproveitamento do licor sulfítico, para produção de proteína não venha a ser viável, economicamente, do ponto de vista ecológico e social, a redução do poder pode ser uma realidade.

Tabela 3 - Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio no licor sulfítico e nos meios de crescimento esgotados

	DBO ₅ mg/l	Redu- ção (%)
Licor sulfítico sem tratamento	29.000	-
Licor sulfítico tratado	23.600	18,6
Mosto de crescimento (sem AM) ao término da fermentação	9.425	67,5
Mosto de crescimento (com 2,5% de AM) ao término da fermentação	9.802	66,2

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association/APHA - Standard methods for examination of water and wastewater. 14.ed. New York, 1975.
2. Association of Official and Agricultural Chemistry/AOAC - Official methods of analysis. 13.ed. Washington, 1980.
3. Camhi, J.D. & Rogers, P.L. - Multistage continuous of *Candida utilis* on spent sulphite liquors. *J. Ferment. Technol.*, 54:437-449, 1976.
4. Harris, E.E.; Saeman, J.F.; Marquardt, R.R.; Hannan, M.L. & Rogers, S.C. - Foeder yeast from hydrolyzates and still residues. *Ind. and Engineering Chemistry*, 40:1220-1223, 1948.
5. Harris, E.E.; Hajny, G.J. & Johnson, M.C. - Protein evaluations of yeast grown on wood hidrolyzate. *Ind. and Engineering Chemistry*, 43:1593-1596, 1951.
6. Holderby, J.M. & Moggio, W.A. - Utilization of spent sulfite liquors. *J. WPCF*, 32:171-181, 1960.
7. Inskeep, G.C.; Wiley, A.J.; Holderby, J.M. & Hughes, L.P. - Food yeast from sulfite liquor. *Ind. and Engineering Chemistry*, 43:1702-1711, 1951.
8. Pederson, C.S. - Microbial products consumed in foods. In: - Microbiology of food fermentation. 2.ed. Avi, Westport, Connecticut, 1979.
9. Peppler, H.J. - Food yeast. In: - Rose, A.H. & Harrison, J.S., eds. - The yeast. London, Academic Press, p.421-462, 1972.
10. Reed, G. & Peppler, H.J. - Yeast technology. Avi, Westport, Connecticut, 1973.
11. Reed, G. - Industrial microbiology. Avi, Westport, Connecticut, 1982.
12. Sant'Anna, E.S. & Aquarone, E. - Influência da água de maceração de milho no crescimento de *C. utilis* em licor sulfítico, para produção de concentrado proteico. São Paulo, 1983. (Tese).
13. Sant'Anna, E.S. & Aquarone, E. - Licor sulfítico (licor negro) como substrato para o crescimento de *C. utilis*: estudo experimental. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 14:285-289, 1983.
14. Somogyi, M. - A new reagent for the determination sugar. *J. of Biological Chemistry*, 160:61-69, 1945.
15. Underkofler, L.A. & Hickey, R.J. - Industrial fermentations. New York, Chemical Publishing, 1954.

CURSO DE MECANISMOS DE AGRESSÃO E DEFESA

Cecília Magaldi

Deptº de Medicina Legal e Medicina em Saúde Pública
 Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP
 Campus de Botucatu
 18600 Botucatu SP, Brasil

& Augusto Cezar Montelli

Deptº de Clínica Médica
 Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP

Resumo

O curso de Mecanismos de Agressão e Defesa ministrado aos 138 alunos do 2º ano de Medicina Humana e Medicina Veterinária e 3º ano de Biologia (modalidade Bacharelado), em 1970 procurou basear o processo de ensino-aprendizado numa estrutura criadora e integrada. Em seu desenvolvimento foram estudados os processos implicados num fenômeno mórbido, enfatizando-se a importância da interação agente-hospedeiro-meio na produção de um estímulo eficaz e da resposta do organismo vivo a este estímulo, que pode ou não impedir a evolução do processo patológico. Foi ressaltado que as ações que se exercem sobre tal processo devem se desenvolver em programas de saúde, com participação multiprofissional. O ensino formativo e integrado compreendeu as diferentes disciplinas participando conjuntamente ou em sequência adequada em cada tema abordado. Do estudo dos agentes agressores se responsabilizaram as disciplinas de Microbiologia e Parasitologia; do mecanismo e método de controle da interação incumbiram-se a Medicina Preventiva e a Saúde Pública e das defesas orgânicas ou das lesões produzidas trataram a Imunologia e a Anatomia Patológica Geral. A avaliação do aproveitamento dos estudantes foi aferida por meio de conceitos (bom, regular ou mau) baseados em diversos parâmetros (testes de verificação do estudo prévio, testes de avaliação do aproveitamento, conceito - relacionado ao interesse, dedicação e frequência do estudante). Questionário preenchido pelos alunos ao término do curso possibilitou análise das opiniões do grupo em relação a diversos aspectos do mesmo. Conclui-se que esta foi uma experiência extremamente válida, tanto para os docentes, quanto para os estudantes dela participantes.

Summary

Course on Mechanisms of aggression and defense

The 1970 Course on Mechanisms of Aggression and Defense (Host-Parasite Relationships) given to 138 medical, veterinary and biology students tried to establish a creative and integrated structure on which to base the

learning-teaching process. The processes implicated in the morbid phenomenon were studied and the importance of the interaction among morbid agent-host-environment was emphasized especially in relation to the production of a efficacious stimulus and the response of a living organism to this stimulus. It was stressed that possible actions on this process have to be developed in multiprofessional health programs. Different disciplines participated in the program, jointly or one after other according to the nature of each theme. The disciplines of microbiology and parasitology took over the study of the aggressive agents; the disciplines of Preventive Medicine and Public Health taught the mechanisms of the morbid-agent-host parasite interrelationships and methods for its control; finally the disciplines of immunology and general pathology presented the organic defenses and the type of developed lesions. One of three score (good-medium-bad) was given to each student taking into account: tests for previous knowledge, tests of proficiency and general appraisal including interest dedication and frequency. A set of questions about the course answered by the students allowed us to analyse the opinions of the group concerning to different aspects. We have concluded that this experience was extremely valid both for students and teachers involved.

Introdução

A missão fundamental de uma instituição universitária como a nossa é a de formar cidadãos conscientes e profissionais competentes, entendendo-se por competência a formação adequada para o equacionamento e a solução dos diferentes problemas inerentes ao seu campo profissional, com os recursos de que dispõe o país. E mais do que isso, dar aos estudantes condições adequadas para prosseguir fora da faculdade os estudos nela iniciados e, assim, capacitá-los a compreender e integrar os novos conhecimentos que a ciência vem proporcionando à humanidade (6).

Para bem cumprir tais objetivos, é forçoso que a instituição concretize em todos os seus níveis a integração prevista regimentalmente e que assuma metodologia de ensino condizente com as modernas conquistas das ciências da educação. E que esta almejada integração se reflita como um conjunto de atitudes consistentes e coerentes com um mesmo fim de todos os seus participantes (professores, alunos e funcionários) e não apenas como um conjunto de matérias, prédios ou normas regulamentares.

Foi dentro desta ordem de idéias que se estruturou o Curso de Mecanismos de Agressão e Defesa da FCOMBB (Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu) em 1970, procurando dimensionar a educação num processo de ensino-aprendizado calcado numa estrutura mais criadora e racionalmente integrada.

A metodologia adotada visou dar ao estudante uma formação segura e não uma série de informações; um sentido de responsabilidade e iniciativa no próprio aprendizado e não um ensino paternalista e despersonalizante; uma orientação de estudo em grupo, fundamentalmente, uma oportunidade de aprender a aprender.

O propósito fundamental desta divulgação é o de incentivar a realização e o aprimoramento de projetos similares em nosso meio.

Objetivos do curso

Objetivou-se no desenvolvimento do curso estudar os processos envolvidos num fenômeno mórbido, mostrando-se a importância da interação agente-hospedeiro-meio na produção de um estímulo eficaz e da resposta do organismo vivo a este estímulo biológico, que pode ou não impedir a evolução do processo patológico, por meio de modificações bioquímicas, funcionais ou estruturais (3). Enfatizou-se que as ações que se exerçam sobre este processo devem ser desenvolvidas em programas de saúde, com participação multiprofissional (1).

Características gerais

O curso foi ministrado aos 138 alunos do 2º ano de Medicina Humana e Medicina Veterinária e 3º ano de Biologia (modalidade bacharelado) da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, de 03 de agosto a 12 de dezembro de 1970.

Estruturou-se o ensino de forma integrada, as diferentes disciplinas participando conjuntamente ou em sequência adequada em cada tema abordado. Do estudo dos agentes agressores se responsabilizaram as disciplinas de Microbiologia e Parasitologia; do mecanismo e método de controle da interação incumbiu-se a Medicina Preventiva e das defesas orgânicas ou das lesões produzidas se encarregaram a Imunologia e a Anatomia Patológica Geral.

Metodologia didática

Como orientação geral o curso obedeceu às normas do ensino formativo (2), cabendo ao estudante um papel preponderante em seu próprio aprendizado, assumindo responsabilidade e iniciativa e atuando dinamicamente em todas as atividades didáticas. Assim, não foram ministradas aulas teóricas tradicionais e nem se realizou avaliação do aproveitamento por notas; enfatizou-se o estudo em grupo; procurou-se programar apenas o necessário, reduzindo-se a matéria estudada tradicionalmente nos cursos clássicos das disciplinas implicadas.

O processo didático estabelecido para que o estudante atingisse o aprendizado pretendido foi o seguinte:

- 1) Forneceu-se uma lista da matéria a ser estudada semanalmente nos textos adotados (livros, apostilas, xerox).
- 2) Para avaliação do estudo da matéria programada houve no início de cada semana um Teste de Verificação de Estudo (TVE) sob a forma de testes ou problemas simples a serem respondidos no máximo em 30 minutos. Em seguida, discutia-se com a classe cada questão, com participação dos alunos docentes das disciplinas envolvidas. A cada TVE foi conferido um conceito ao estudante.
- 3) Desenvolveram-se a seguir as programações teórica e prática, compreendendo as seguintes atividades:
 - a) Seminários - realizados em cada disciplina, particularmente, com o objetivo de uniformização e suplementação da matéria contida nos textos indicados;
 - b) Seminários interdisciplinares - efetuados com a finalidade de analisar e exemplificar conjuntamente a integração existente entre os diferentes aspectos de um mesmo tema;
 - c) Conferências - alguns conferencistas discorreram para as classes sobre sua experiência pessoal em assuntos de interesse relevante;
 - d) Aulas práticas - compreenderam trabalhos de campo e em laboratório (onde pequenos grupos de alunos trabalharam também em modelos experimentais), proporcionando-se uma preparação teórica prévia.
- 4) Testes de Avaliação do Aproveitamento (TAA) - No decorrer do curso houve 3 avaliações de aproveitamento correspondentes ao término de períodos didáticos estabelecidos pelas diversas disciplinas. Estes TAA consistiram de testes ou questões de breves respostas, sendo a matéria cumulativa para os TAA subsequentes. Os alunos receberam um conceito pelo seu desempenho em cada um deles.

Tabela 1 - Distribuição percentual dos resultados do curso

Resultados	Disciplinas	Anatomia Patol. Geral	Medicina Preventiva	Microbiol.e Imunologia	Parasi- tologia
Aprovados por média	23,8	64,4	73,9	51,4	
Aprovados em exame	49,6	35,5	25,3	44,9	
Aprovados em 2ª época	14,7	-	0,7	2,2	
Reprovados	11,8	-	-	1,4	
Total	99,9	99,9	99,9	99,9	99,9

Avaliação do aproveitamento

A avaliação do aproveitamento dos estudantes foi sistemática e baseada nos seguintes parâmetros:

- 1) Conceito médio dos testes de verificação de estudo realizados pela disciplina;
- 2) Conceito médio dos testes de avaliação do aproveitamento da disciplina;
- 3) Conceito do corpo docente da disciplina sobre o aluno, baseado em sua frequência às aulas, seu interesse e dedicação, sua responsabilidade e participação nos seminários e aulas práticas.

Em cada disciplina houve uma Ficha curricular (Anexo 1) individual, na qual foram lançados periodicamente os conceitos acima descritos. Os estudantes de conceito final Bom foram considerados aprovados; os demais realizaram exames escrito, prático e/ou oral ou exame de segunda época. Ao término do curso, com o objetivo de satisfazer normas regulamentares, a média dos 3 conceitos sofreu uma aferição numérica, ajustada adequadamente ao currículo do aluno.

Avaliação do curso

O curso de Mecanismos de Agressão e Defesa foi uma nova experiência para os estudantes e docentes dele participantes e, como tal, sujeito a revisões e reformulações. Assim, solicitou-se a cada aluno ao término do curso que desse a sua opinião sincera e consciente, respondendo a um questionário especialmente elaborado, com 14 itens, para cujas respostas foram fixadas, em segmento de reta, faixas relacionadas a conceitos. A opinião particular dos estudantes quando reunidas e analisadas em conjunto se constituem em fonte importante de julgamento do que ocorreu e de aprimoramento para futuras experiências similares.

Resultados e Comentários

Na Tabela 1, estão resumidos os resultados finais do curso.

Houve maior taxa de aprovação por média nas disciplinas de Microbiologia-Imunologia e de Medicina Preventiva e verificaram-se maiores taxas de aprovação por exame final nas disciplinas de Anatomia Patológica e Parasitologia. A maior taxa de aprovados em 2ª época observou-se na disciplina de Anatomia Patológica Geral em que ocorreu também maior percentual de reaprovação.

A análise de algumas respostas dos estudantes ao questionário de avaliação do curso mostrou os seguintes resultados:

Tabela 2 - Aproveitamento nas diferentes atividades do curso (%)

Atividades	Conceito			
	Bom	Reg.	Mau	Em branco
Aulas práticas de microscopia	86,2	11,2	1,6	0,8
Aulas práticas de macroscopia	43,5	39,5	17,0	0
Experimentos em anat. patol. geral	21,8	37,9	15,3	25,0
Seminários de med. preventiva	43,5	38,0	11,2	7,3
Exercícios epidemiológicos	33,7	45,7	13,6	7,0
Levantamento parasitológico	67,0	21,8	7,2	4,0
Aulas práticas de parasitologia	47,6	37,0	9,7	4,8
Seminários de parasitologia	40,3	37,0	17,0	5,7
Experimentos de parasitologia	43,5	33,7	4,8	18,0
Seminários de microbiologia	56,4	33,0	5,7	4,9
Aulas práticas de microbiologia	70,9	21,8	3,3	4,0
Estágio final de microbiologia	62,0	26,6	7,3	4,0
Demonstrações práticas de microb.	45,1	41,9	6,4	6,6
Seminários multi-disciplinares (integrados)	62,0	32,4	4,0	1,6

Tabela 3 - Grau de afinidade pela matéria (%)

Disciplina	Conceito			
	Grande	Média	Pequeno	Em branco
Anatomia patol. Geral	67,7	26,6	3,2	2,4
Medicina preventiva	37,1	45,1	12,1	5,6
Microbiol.-imunologia	63,7	28,2	4,0	4,0
Parasitologia	53,3	35,4	5,6	5,6

Anexo 1 - Ficha curricular, 1970. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, Curso de Agressão e Defesa

FICHA CURRICULAR — 1970

DISCIPLINA DE _____

Nome:		
Curso:	n.º	
Data do Nasc.:	Est. Civil:	Natural:
Enderêço:		
Ano(s) em que prestou vestibular:		

A) — FREQUÊNCIA:

Aulas	N.º de Aulas	N.º de Faltas
Práticas		
Seminários		

B) — APROVEITAMENTO:

1 — Conceito dos Testes de Verificação de Estudo

1.º	2.º	3.º	4.º	5.º	6.º	7.º	8.º	9.º	10.º	11.º	12.º	13.º	14.º	15.º	16.º	17.º	18.º	Média

2 — Conceito dos Testes de Avaliação de Aproveitamento

T. A. A.	C	E	B	CONCEITO
Primeiro				
Segundo				
Terceiro				
MÉDIA				

3 — Conceito do Corpo Docente:

MÉDIA FINAL

C) — OBSERVAÇÕES:

- 1) Aproveitamento nas diferentes atividades do curso (%) (Tabela 2).
- 2) Materiais didáticos mais úteis:
 Ficha-resumo de Anatomia Patológica Geral - 59,6%
 Ficha-resumo de Microbiologia - 52,4%
 Apostilas - 26,6%
- 3) Grau de afinidade pela matéria (%) (Tabela 3).
- 4) Opinião sobre Organização e Metodologia didática do curso:
 Boa - 58,9%
 Regular - 29,8%
 Má - 3,2%
 Em Branco - 8,0%
- 5) Opinião sobre o conjunto de docentes, sob o aspecto didático:
 Bom - 66,3%
 Regular - 24,3%
 Mau - 5,2%
 Em branco - 4,2%
- 6) Opinião sobre relacionamento aluno-professor, durante o curso:
 Bom - 59,8%
 Regular - 28,7%
 Mau - 6,8%
 Em branco - 4,6%
- 7) Conceito final sobre o curso, em seu conjunto:
 Bom - 69,3%
 Regular - 29,8%
 Mau - 0,0%
 Em Branco - 0,8%

Ao se analisar as opiniões dos discentes manifestadas nas respostas ao questionário pode-se concluir que foi esta uma experiência extremamente válida. Reforça tal afirmativa o conceito final dos estudantes sobre o curso, pois cerca de 70% dos mesmos o considerou como bom, em concordância com o consenso dos docentes participantes.

Mais que os resultados acima referidos e o número elevado de alunos aprovados, esse modelo educacional mostrou-se bastante satisfatório, pelo que proporcionou durante sua execução, em termos de identificação de objetivos e conjunção de esforços entre os elementos do corpo docente e estudantes.

Apesar de se reconhecer a timidez das reformulações educacionais que o curso encerra, há que se considerar as dificuldades enfrentadas para se efetuar qualquer modificação na estrutura pedagógica de cursos universitários em nosso meio, dados os dispositivos legais e a estrutura de poder vigentes.

Deste modo, com consciência das limitações do processo pedagógico proposto, empreendeu-se esta experiência calcada em programas multidisciplinares não dependentes de estruturas departamentais rígidas. Acredita-se que neste processo exista a flexibilidade necessária para assegurar ao estudante uma contínua adaptação ao processo educativo e à evolução do conhecimento científico.

Muito embora nos anos subsequentes essa experiência não tenha encontrado condições para ser reproduzida e aperfeiçoada na Faculdade, parece que se constituiu em modelo e estímulo constante para empreendimentos educacionais similares em nosso meio (4, 5), o que pelo menos, proporcionou sentimento de gratificação ao grupo participante.

Referências Bibliográficas

1. Almeida, E.S. & Magaldi, C. - O Departamento de Medicina Preventiva da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu e a formação médica

- integral: programação inicial de trabalho. VII Reunião Anual da Associação Brasileira de Escolas Médicas, Niterói, 23 a 26 de agosto de 1969. Anais. Oficina Gráfica da Universidade Federal do Rio de Janeiro, p.207-220, 1969.
2. Dutra de Oliveira, J.E; Câmara, A.; Marasco, M.L.; Rosseto, M.J.; Souza, N.; Rezende, T.A.; Moura, J.L.A. & Montelli, A.C. - Uma experiência de ensino médico formativo na Faculdade de Botucatu. Rev. Assoc. Med. Brasil., 13:406-408, 1967.
 3. Faculdade de Ciências Médicas. Universidade de Brasília, Serviço Gráfico do Senado Federal, Brasília, p.30-31, 1968.
 4. Magaldi, C.; Almeida, M.M.M.B.; Cortez Jr., L.S.; Montelli, A.C.; Almeida, E.S.; Meira, D.A. & Souza, N. - Internato de doenças tropicais e infecciosas e Medicina Preventiva. IX Reunião Anual da Associação Brasileira de Escolas Médicas, Curitiba, 4 a 7 de Setembro de 1971: Anais. Curitiba, Imprensa da Universidade Federal do Paraná, p.179-187, 1971.
 5. Montelli, A.C.; Michelin, O.C.; Peres, R.F.C.; Machado, P.E.A.; Nacum, P.C. & Campana, A.O. - Ensino de clínica médica: curso renovado de laboratório clínico. Rev. Brasil. Educ. Med., 2:37-43, 1978.
 6. Ribeiro, D. - A Universidade e a nação. Imprensa Universitária do Ceará, 1962.

Docentes participantes do curso (co-autores)

Eurivaldo Sampaio de Almeida; Maria Aparecida Barbosa; Claudia E.P. Campos; Kinnie I. Coelho; Fernando A.M. Azevedo Corrêa; Lúpercio de Souza Cortez Junior; Regina Maria S.T. Decarlis; Marcelo F. Franco; Massako Tyda; Maria Cristina I. Mattos; Mario Rubens Montenegro; Gilberto Moreno; Norma Gerusa S.S. Motta; Maria Iraci C. Ramos; Aristides C. Rudge; Ednir Salata; Maria Inês T.L. Sogayar; Roberto Sogayar; Celso R.V. Silva; Nelson de Souza; Darci S.A. Watanabe.

TESTES DE SENSIBILIDADE BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS: O ANTIPOGRAMA

Italo Suassuna*

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

Periodicamente, em mesas redondas ou reuniões médicas, renovam-se discussões sobre os acertos e desacertos dos testes de sensibilidade a antimicrobianos, ou antibiograma. Isto vem persistindo e se ampliando por cerca de 30 anos (9, 21, 22).

De fato, a partir de 1945 quando difundido e aceito o uso de antibióticos, tornou-se evidente que, além de diferentes espécies bacterianas poderem mostrar resposta diversa a um mesmo antimicrobiano estípites integrantes de uma mesma espécie podiam variar com o tempo, ou em diferentes locais, tornando-se, quase que imprevisivelmente, resistentes aos agentes antimicrobianos aos quais anteriormente respondiam de forma satisfatória (15). O aparecimento dessas formas de microrganismos resistentes aos antibióticos passou a constituir o principal obstáculo à utilização eficaz desses medicamentos com propósito terapêutico. Por essa razão tornaram-se indispensáveis investigações sobre a sensibilidade das bactérias aos antibióticos, com a finalidade de obter-se mais alta eficiência no seu emprego como medicamento.

As formas resistentes surgem por seleção natural e a partir das populações bacterianas, não havendo, como acreditou-se no passado, a pretendida "adaptação" das bactérias a essas drogas. Essa seleção é, em geral, exercida pelas concentrações de antibióticos que são atingidas *in vivo*, em particular nos portadores de infecções crônicas, nos que hajam recebido sem maiores justificativas antibióticos a título profilático ou, por intercomunicação (contaminação cruzada) em pacientes hospitalizados. Nestes, ou nas comunidades, os clones (descendentes proveniente de multiplicação assexuada) resistentes, assim selecionados, substituem progressivamente as formas sensíveis, que são eliminadas pelos antimicrobianos mais intensa e indiscriminadamente usados.

Responsabilidades específicas do laboratório

O que se pode especificamente exigir do laboratório é que seja capaz de determinar o agente etiológico do processo infeccioso, desde que receba, ou seja encarregado de obter, o espécimen adequado para exame. Em havendo importância em estimar numericamente os agentes infecciosos, em espécimes como sangue e urina, a requisição clínica deve assim especificar.

Em relação ao antibiograma, a segunda etapa será, naturalmente verificar a "sensibilidade" do agente etiológico identificado, para decisão sobre a melhor indicação terapêutica.

O propósito de qualquer teste de sensibilidade é determinar qual a concentração mínima de um antimicrobiano, capaz de atuar sobre o microrganismo isolado. A relação entre essa concentração e aquela que se possa atingir no local da infecção indicarão se as medidas terapêuticas pretendidas terão possibilidade de êxito.

* (Dedicado a Ivone).

Tema relatado no 1º Simpósio Internacional sobre Antibioticoterapia. Associação Médica Brasileira e Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro, 11-14 de maio de 1983.

Dois tipos de valores podem ser definidos *in vitro*, nessas circunstâncias: a. a concentração inibitória mínima (CIM), isto é, a menor concentração de antibiótico em relação ao volume do meio de cultura (expressa em μg ou unidades/ml) capaz de inibir o crescimento bacteriano - essa será a concentração inibitória mínima bacteriostática se, nessas condições, o germe não cresce, mas também não morre; b. quando se comprova que houve a morte da dose bacteriana adicionada à concentração testada do antibiótico, fala-se da concentração bactericida mínima (CBM), o que, em certas ocasiões, é significativo conhecer, por suas várias implicações clínicas.

Se a CIM da bactéria em estudo for inferior à concentração média obtida com doses terapêuticas do antibiótico, no local da infecção, o germe é considerado sensível. Na maioria dos casos, o nível a se considerar, decorrente de terapêutica, é o atingido na circulação admitindo-se, como fator de segurança, que a sensibilidade será satisfatória quando a CIM for 2-4 vezes inferior às taxas séricas (20).

Embora pretendendo unicamente medir, de forma artificial, a reação entre um parásito e as drogas que potencialmente o combatem, o antibiograma é influenciado por muitos fatores, o que impõe cuidadosa padronização de condições experimentais, para permitir que os resultados alcançados, em diferentes tempos e em diferentes lugares, possam ser comparados. As condições sob as quais são assim obtidos os valores relatados devem, em consequência, ser perfeitamente definidas.

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) apresentam quanto à execução, duas modalidades principais: métodos de diluição e métodos de difusão.

Métodos de diluição - Foi a primeira modalidade utilizada para averiguar variações de sensibilidade e empregada, também, para definir a atividade de antibióticos por meio de "unidades", antes de sua obtenção em estado puro, como a unidade "Oxford" de penicilina. Diferentes concentrações de um antimicrobiano (ex.: 20, 10, 5, 2,5, 1,25, 0,62 $\mu\text{g}/\text{ml}$) são ajustadas, no meio de cultura adequado ao crescimento do germe. A menor concentração capaz de inibir esse crescimento será a CIM. O teste pode ser feito em meio líquido ou em meio sólido. Normalmente haverá uma faixa de concentrações entre aquela em que o germe foi inibido (CIM) e a em que ele foi morto (CBM). Essa faixa pode ser estreita (CBM= 2-3 vezes a CIM) ou muito elevada (CBM acima de 16 vezes a CIM) o que tem significado especial ao serem esperados efeitos bactericidas (24). O fenômeno do alargamento da faixa entre a CIM e a CBM tem, particularmente, perturbado o tratamento de endocardites e, recebido o nome de tolerância, quando aplicado a cocos Gram-positivos (7, 17).

Métodos de difusão - Menos simples em sua conceituação são, entretanto, de mais fácil realização. Inspiram-se em que, ao agir sobre o crescimento bacteriano, em um meio sólido, cada antibiótico produzirá um halo de inibição do crescimento. Esse halo é proporcional ao peso ou concentração da droga colocada sobre o meio. O antibiótico é, em geral, depositado em pequeno disco de papel de filtro, donde a alternativa de designar-se o método dos discos. O tamanho do halo, em proporção com a CIM (verificada pelo método de diluição) dirá se o germe pode, ou não, ser considerado sensível. Como a solubilidade e a capacidade de difusão de cada antimicrobiano é variável, haverá halos, de tamanhos diversos, significativos ou não, em relação a cada antibiótico. Isto torna a interpretação desta técnica mais difícil que nos testes de diluição.

Por todo o exposto, torna-se evidente que, na execução de qualquer método, é compromisso e obrigação do laboratório controlar rigorosamente as diversas variáveis que modificam os resultados (3), no sentido de sua reprodutibilidade, à exemplo de:

a. Meio de cultura - Meios diversos não são equivalentes. A tendência quase geral é utilizar o meio de Mueller-Hinton (1), por sua melhor padronização, e por não conter fatores antagônicos aos testes de sensibilidade a sulfas ou ao crescimento de alguns germes como *Neisseria*. Sua não utilização pode originar erros grosseiros em relação às drogas mencionadas (19). Além da capacidade nutritiva do meio, nos testes de difusão há a considerar a sua umidade residual e espessura, que introduzem alterações nos halos a serem interpretados;

b. Densidade do inóculo - A "dose", ou seja, a quantidade de microrganismos introduzidos no meio, para interagir com os antibioticos, talvez seja o fator de maior influência na interpretação do antibiograma. É volumosa a literatura a respeito, e a influência do inóculo se acentua nos testes de amostras produtoras de enzimas inativadoras de antobióticos beta-lactâmicos, como penicilinases e cefalosporinas;

c. Tempo e temperatura de incubação - A temperatura talvez seja a única variável que se possa controlar no sentido de equivalência com o hospedeiro. Entretanto, a utilização de temperaturas mais baixas, levando à variação de resultados, com importância para a aplicação clínica, foi relatada, em função de cefalosporinas e espécies de *Staphylococcus* (2). O tempo de incubação é sobremodo significativo para os testes de difusão (discos). Esses testes foram padronizados para os gérmenes de crescimento rápido e abundante no meio de cultura recomendado.

As formas defectivas resistentes à meticilina e cefalosporina, e formas produtoras de penicilinase podem exigir variação do tempo de incubação para uma melhor interpretação dos resultados do antibiograma (20);

d. Natureza dos microrganismos - Para gérmenes exigentes ou de crescimento lento como micobactérias, actinomicetos, difteriformes, hemófilos, neisserias patogênicas, e outros, em geral não têm validade os resultados de testes de difusão. Infelizmente, no nosso meio, o desconhecimento aliado às pressões das atividades clínicas, eventualmente os indicam para esses microrganismos.

Evidentemente a atmosfera de incubação, segundo a exigência da amostra bacteriana testada, deve ser respeitada. No entanto, as condições de anaerobiose ou microaerofilia alteram os padrões de interpretação dos testes dos discos.

Certos microrganismos, mesmo de bom crescimento, podem gerar problemas especiais de interpretação dos antibiogramas, em testes de difusão como *Proteus* e *Pseudomonas* (1, 10, 20);

e. Fatores físico-químicos - Necessita-se ajustar corretamente essas variáveis, cabendo no entanto,ressaltar, que não existe padrão único aplicável a quaisquer microrganismos e a todos os antibioticos. Por exemplo, tanto nos testes de sensibilidade quanto in vivo, os aminoglicosídeos e macrolídeos (eritromicina) são estimulados em sua ação por pH alcalino, e as ciclinas por pH ácido. Não se recomenda a adição de carboidratos fermentáveis aos meios utilizados nos testes, exatamente por que isto leva à acidificação. Também a incubação em microaerofilia, implicando em atmosfera enriquecida com gás carbônico, leva a alguma acidificação do meio e altera a atividade de antibioticos como os já citados. Os aminoglicosídeos não são aplicados em antibiogramas convencionais quando em anaerobiose. Um ajuste da concentração do íon magnésio é necessário para a correta interpretação da ação de gentamicina sobre *Pseudomonas* e a correção de osmolaridade, com meios hipertônicos, é necessária para testar a resistência de *Staphylococcus* à meticilina e a algumas das cefalosporinas;

f. Controle de qualidade - Finalmente, como o nosso país não possui sistema oficial eficiente de controle de qualidade de insumos para as organizações de saúde, recai sobre os laboratórios ou sociedades científicas (como a Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e a Sociedade Brasileira de Microbiologia) o ônus de controlar a potência, a qualidade, a origem, a conservação, a estocagem e a distribuição dos produtos que utilizam. Muitas vezes, erros grosseiros, devidos a imperfeições de produtos disponíveis no mercado, são assim surpreendidos. O designado Projeto Coba (Controle Bacteriológico) executado pela Sociedade Brasileira de Microbiologia, com o suporte da Merck Sharp & Dohme, apontando volumes momentosos de erros na execução de antibiogramas (12), poderia eventualmente reorientar-se no sentido do tão necessário controle de qualidade dos reativos disponíveis.

Embora os métodos de diluição sejam apontados como os mais confiáveis, o ônus para a sua execução (uma série de diluições para cada antibiotic) levou a que predominasse, em bacteriologia clínica, os testes de difusão. É nesses, justamente, onde a padronização é mais difícil e, consequentemente, onde se aponta maior número de causas laboratoriais de erro.

As tentativas de padronização vêm de 1961, com uma publicação da Organização Mundial de Saúde (26). Em seguida, apareceu um estudo colaborativo internacional, concluído em 1971 (6).

Até o momento, as publicações de Bauer & col. (1), nos E.U.A., Stokes & col. (20), na Inglaterra, e Ericsson & col. (6), nos países escandinavos, são as que melhor conseguem estabelecer os propósitos de padronização, sendo mais rigorosa, mas nem sempre facilmente exequível, a proposta de Bauer & col. (1).

Pinto (16) teve oportunidade de comparar essas técnicas, não assinalando diferenças substanciais de resultados.

Impõe-se, entretanto, uma constante reavaliação de interpretação, e a definição de novos padrões, a partir de divergências farmacológicas no uso de antimicrobianos e da introdução de novos agentes terapêuticos. Isto vem sendo realizado presentemente pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (13) nos E.U.A.

Interpretação, colaboração e necessidades clínicas

Do que foi exposto, há que constar que, do ponto de vista médico, o isolamento e a identificação do agente etiológico do processo infecioso constituem as exigências primárias para que se possa, corretamente, realizar um antibiograma. Os testes com cultura mista não são recomendáveis, ressalvadas circunstâncias excepcionais (21).

Só a colaboração e a comunicação entre a clínica e o laboratório garantirão a qualidade do exame realizado que dependerá, entre tantos fatores: da correção com que foram formuladas as suspeitas clínicas; do acerto quanto à forma e ao local de colheita do espécime; da acessibilidade da(s) lesão(ões), da conservação e transporte do material de acordo com a suspeita etiológica; dos recursos utilizados para evitar a interferência de floras normais, quando presentes, e afastar contaminações; e do conhecimento da terapêutica antiinfecciosa em uso, quando for este, o caso (12). A iniciativa de medidas para a orientação do laboratório, é responsabilidade essencial dos que solicitam os exames. Sendo adequadas ou suficientes as informações supridas ao laboratório e, este, hábil na execução de sua tarefa, os resultados dirão da presença de germes sensíveis ou resistentes e, na maioria das vezes poder-se-á inferir sobre a existência de infecção mista ou de parasitas intra-celulares, ou não. Qual o valor dessas informações? Elas nada dizem sobre que dose e duração do tratamento devam ser indicados. Nada informam sobre as reações do hospedeiro, seja com o parasita, seja com o medicamento, o que deve ser do conhecimento, presumível ou certo, do clínico.

Para o sucesso da antibioticoterapia, a partir do conhecimento de um agente etiológico cuja sensibilidade foi indicada pelo laboratório, há que considerar, entre tantos condicionantes para o êxito do tratamento, se as lesões são fechadas ou abertas; contaminadas ou não; purulentas ou granulomatosas; superficiais, justa-mucosas, profundas, ou sob barreiras anatômicas; se há sequestros e exigência de limpeza cirúrgica ou desbridamento. Não virá do laboratório as informações sobre o estado de debilidade, imunodepressão ou deficiências do paciente; se pela ocorrência de antibioticoterapia prévia, há probabilidade de superinfecção; e, finalmente, se pelo local e condições em que deve atuar o medicamento, devam ser empregadas doses bactericidas ou apenas bacteriostáticas, ou se são indicadas associações sinérgicas de antimicrobianos.

No que possam ser indagações, nas situações acima citadas o laboratório pode voltar a ser de ajuda, na dependência de consulta, entendimento e colaboração prévios, já que as mesmas indagações, irão impor ao laboratório afastar-se de rotinas pré-estabelecidas, controladas e operantes.

Além de identificação dos microrganismos e indicação de sua sensibilidade, Jawetz & col. (9), já no começo da era dos antibióticos apontavam outras hipóteses de colaboração do laboratório como definir o nível de medicamento nos humores e excreções, avaliar sinergia e, orientar sobre toxicidade recidiva e reinfeção. Advertiam tornar-se evidente que não seria necessário, nem desejável, fazer tudo isto, em cada caso.

Embora a informação farmacológica esteja disponível, é preciso recordar que, enquanto o antibiograma convencional é interpretado em relação com o nível sérico, a dose terapêutica deve, em cada caso, ajustar-se ao local em que se instala a infecção, a fim de afastar "falhas" do antibiograma, vez que são óbvias as variações de concentração dos antibióticos em urina, líquor, bile, líquido sinovial, tecidos, secreções, etc. quando comparados com o sangue (27).

Os testes de diluição têm algumas indicações específicas e caminham para sua simplificação (5), embora persistam impedimentos evidentes, de ordem operacional e econômica, em nosso país, para sua adoção em rotina. Além de indicados para germes de crescimento lento, como micobactérias (8), esses testes podem ser usados para avaliar a ligação e inativação de antibióticos com proteínas séricas, ou interferências medicamentosas e de outra natureza, bem como para caracterizar o fenômeno de tolerância, referido em relação às endocardites.

Ainda não existe rotina definida para testes de sensibilidade dos germes anaeróbios a antibióticos (25). Se além, de apressada presunção diagnóstica sobre isolamentos de anaeróbios - a exemplo de considerá-los significativos quando isolados nas mucosas que constituem seu habitat - adverte-se a presença de anaeróbios com certa frequência em quadros de difícil controle terapêutico, como bacteriemias, artrite séptica, osteomielite e abscessos cerebrais. Nesses casos o auxílio e a orientação laboratoriais devem estar disponíveis (11).

A principal indicação para avaliar-se o efeito sinérgico de antimicrobianos corresponde ao tratamento de espécies notavelmente resistentes, com destaque para *Pseudomonas* além de *Enterobacteriaceae* (*Proteus*, *Providencia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*), *Staphylococcus* e enterococos. Pela frequência desses microrganismos, a recomendação do teste vem sendo enfatizada, mas na nossa experiência, nem sempre com possibilidade de resultados seguros (18), embora não se podendo excluir sua eventual utilidade (14).

Na hipótese de conflito, entre a indicação do antibiograma e os resultados clinicamente atingidos, se racionalmente, ou em consulta com o microbiologista clínico, excluem-se fatores como latência, sequestro, germe inatingido pelo antimicrobiano devido à localização, alterações de flora, etiologia múltipla, reinfeção, ou modificações de resposta do hospedeiro (inflamatória e imunitária), há que se considerar observações como as de Bouvet & col. (4), ao estudarem as diferenças na concentração sérica de ampicilina de administração contínua em pacientes com meningite: "... não foram obtidas conclusões definitivas neste estudo. Muitos fatores complexos foram envolvidos e, há, provavelmente, mais de uma razão para as diferenças nas concentrações séricas de ampicilina, incluindo a distribuição, a combinação com proteínas, o metabolismo extrarrenal do antibiótico e as diferenças de função tubular.

Essas considerações devem ser guardadas. Primeiramente, porque a concentração sérica de um medicamento continuamente injetado pode ser estimada com precisão em um indivíduo normal, mas esse, pode não ser o caso, em paciente criticamente comprometido...".

Ao pensar nisso, antes que discutirmos os erros reciprocos, os médicos e outros profissionais de saúde que, de um lado, lidam de modo imediato com o paciente, e os mesmos, médicos e profissionais, que do outro lado, são responsáveis pela semiótica armada dos laboratórios, deverão reunir-se para interpretar, colaborar e, sobretudo, se entenderem e se informarem sobre seu objetivo, máximo e comum: o paciente (23).

Agradecimentos

À Profa. Maria Cristina Maciel Plotkowski, pela atenciosa revisão da matéria.

Referências Bibliográficas

1. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.

2. Bayston, R. & Swinden, J. - Effects of test conditions on the susceptibility of staphylococci "in vitro" to cephadrine, cephaloridine, cephalexin, and cefuroxime. *J. Clin. Pathol.*, 34:203-207, 1981.
3. Bodily, H.L. & Updyke, E.L. - Microbial sensitivity tests. In: - Diagnostic procedures for bacterial, mycotic & parasitic infections. 5.ed. New York, Amer. Public Health Association, 1970.
4. Bouvet, E.; Gilbert, C.; Gaudebont, C. & Vachon, F. - Differences in serum ampicillin concentrations among patients under constant rate infusion. *Brit. Med. J.*, 2:1164-1165, 1980.
5. Brown, W.J. - MIC susceptibility testing should replace disk diffusion testing. *Clin. Microbiol. Newsletter*, 4:56-57 (Editorial), 1982.
6. Ericsson, H.M. & Sherris, J.C. - Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scandinav. Section B (Suppl. 127)*, 1971.
7. Ghoneim, A.T.M. - Antibiotic tolerance. *Clin. Microbiol. Newsletter*, 3:44-45 (Editorial), 1981.
8. Gontijo Filho, P.P.; Arede, M.N. de & Suassuna, I. - Níveis de sensibilidade "in vitro" de *Mycobacterium tuberculosis* à gentamicina e outros aminoglicosídeos. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 2:25-27, 1971.
9. Jawetz, E. & Marshall, M.S. - The role of the laboratory in antibiotic therapy. *J. Pediat.*, 37:545-554, 1950.
10. Marques, E.A.; Oliveira, E.F. & Suassuna, I. - Variação da sensibilidade a antibióticos em populações bacterianas supostamente homogêneas de infecções do trato urinário. *J. Brasil. Nefrol.*, 5:29-35, 1983.
11. Martin, W.J. - Is routine susceptibility testing of anaerobes necessary? *Clin. Microbiol. Newsletter*, 3:111-112 (Editorial), 1981.
12. Montelli, A.C. - Antibioticoterapia racional: contribuição da microbiologia clínica. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 15:193-201, 1984.
13. National Committee for Clinical Laboratory Standards - 1983. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: tentative standard. Order Code M2-T3, 3:469-496, 1983.
14. Oliveira, E.F.R.; Saad, M.H.F. & Suassuna, I. - Gentamicina e carbenicilina: atividade para *Pseudomonas aeruginosa*. *Fol. Med.*, 86:49-54, 1983.
15. Pereira, A.A. & Suassuna, I. - Espectro de resistência de algumas espécies bacterianas como ajuda subsidiária para sua classificação. *Rev. Brasil. Patol. Clin.*, 17:35-44, 1981.
16. Pinto, E.J.E. - Estudo comparativo dos principais métodos para avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos por difusão em ágar. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia UFRJ. (Tese de Mestrado).
17. Rajashekaraiah, K.R.; Rice, T.; Rao, V.S.; Mash, D.; Ramakrishna, B. & Kallick, C.A. - Clinical significance of tolerant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with endocarditis. *Ann. Int. Med.*, 93:796-801, 1980.
18. Saad, M.H.F.; Oliveira, E.F.R. de & Suassuna, I. - Avaliação de métodos "in vitro" para estudo da atividade da associação de gentamicina e carbenicilina em *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 14:42-47, 1983.
19. Silva, Y.P.S. da; Nunes, M.P. & Suassuna, I. - Estudo "in vitro" sobre a susceptibilidade de *Versinia pestis* isoladas no Brasil, às sulfamidas, tetraciclinas, aminoglicosídeos, penicilinas e eritromicina. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, 21:205-206, 1975.
20. Stokes, E.J. & Waterworth, P.M. - Antibiotic sensitivity tests by diffusion methods. Association of Clinical Pathologists, Broadsheet, 55 (Revised), 1972.
21. Suassuna, I. - Interpretação clínica do antibiograma. *Ars Curandi*, 7:38-50, 1974.
22. Suassuna, I. - Antibiograma. In: - Temas de infecção médica: 1º Curso Beecham. *J. Bras. Med.* (Edição Especial), p.56-58, 1975.
23. Suassuna, I. & Suassuna, I.R. - Laboratory requirements for clinical microbiology. *Rev. Brasil. Patol. Clin.*, 18:90-99, 1982.
24. Suassuna, I.R.; Suassuna, I. & Serpa, C.E.V. - Níveis de sensibilidade de enterobactérias, em particular *Salmonella typhi*, à rifamicina S.V. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, 3:87-93, 1969.

25. Sutter, V. - Susceptibility testing: anaerobic bacteria. In: - Merten, U.P. & Linder, J., eds. - Pathology a medical speciality. Proceedings X Triennial World Congress of Anatomic and Clinical Pathology. World Association of Societies of Pathology, p.457-464, 1979.
26. WHO - Second Report of the Expert Committee on Antibiotics: standardization of methods for conducting microbial sensitivity tests. Technical Report Series n° 210, 1961.
27. Wu, T.C. - Antimicrobial levels in various body fluids. Clin. Microbiol. Newsletter, 4:17-21, 1982.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Celada, F.; Schumaker, V.N. & Sercarz, E.E., eds. - Protein conformation as an immunological signal. New York, Plenum Press, 505p., 1983. US\$ 69.50.

O livro "Protein conformation as an immunological signal" editado por F. Alada, V.N. Schumaker e E.E. Sercarz reúne contribuições de alto valor para o imunologista interessado em aprofundar seus conhecimentos numa área de confluência entre a imunoquímica e imunologia celular. Em realidade, o livro resultou de um "workshop" realizado em Portovenere (La Spezia), na Itália em outubro de 1981 e que agora é lançado pela Plenum Press. Este "workshop" teve como intenção discutir a nível de estruturas bioquímicas temas de grande relevância como "influência do antígeno na conformação dos anticorpos, ativação dos primeiros componentes do complemento, estruturas de reconhecimento dos linfócitos T, estruturas envolvidas na interação T-B etc". Estes e outros assuntos foram abordados pelos imunologistas mais conceituados nas suas respectivas especialidades.

Embora esta publicação tenha sido lançada com quase três anos após o evento que a originou, ela contém uma coletânea de grande valor para os interessados em aspectos moleculares da imunologia celular.

Antonio Campos Neto
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Campus de Ribeirão Preto
14100 Ribeirão Preto SP

Chanock, R.M. & Lerner, R.A., eds. - Modern approaches to vaccines: molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity. New York, Cold Spring Harbor, 457p., 1984. US\$ 62.40.

Trata-se de um livro sobre os 66 trabalhos científicos e posters apresentados no Seminário sobre as Modernas Abordagens para Vacinas Virais, ocorrido em setembro de 1983, no Cold Spring Harbor Laboratory.

Os diversos trabalhos mostram que os significativos avanços no conhecimento do genoma de vários vírus, bem como no estudo da sua estrutura e na função do antígeno protetor do vírus, aliados aos enormes conhecimentos dos fenômenos biológicos e mecanismos imunológicos acumulados antes mesmo da atual era da biologia molecular, vem permitindo o desenvolvimento de novas abordagens tecnológicas no campo da imunoprophylaxia.

Dessa forma, o estudo da estrutura tri-dimensional (em projeção esterográfica) da cadeia x-carbônica de manômero de hemaglutinina da Influenza permitiu a identificação dos sítios de reconhecimento de anticorpos, de ligação de receptores e de aderência ao vírus e, portanto, a determinação da base estrutural do fenômeno de reconhecimento antígeno-anticorpo.

A aplicação desses novos conhecimentos, no entanto, deve vir obrigatoriamente acompanhado de um perfeito conhecimento da patogenia da infecção dos diferentes grupos virais e dos mecanismos imunitários específicos mais importantes na convalescência da doença e resistência à subsequente infecção.

Basicamente, são duas as abordagens utilizadas para a construção de vírus vacinal utilizando estas modernas tecnologias: a. utilizando抗ígenos não replicantes e b. utilizando mutantes atenuados para o uso como vacina de vírus vivos.

a. *Antígenos não replicantes* - Nesta linha vem sendo desenvolvidas as seguintes pesquisas:

1. Expressão de抗ígenos protetores em hospedeiro procariótico, como a expressão do VP1 do vírus da poliomielite em *E. coli* - No entanto, os resultados têm mostrado que a proteína viral é processada rapidamente e é degradada em peptídeos menores, tendo o produto VP1 uma meia vida de menos de 5 minutos e é ainda, aparentemente, extremamente tóxico para *E. coli*. Também tem sido expressos em *E. coli*, em forma de fusão protéica, outros抗ígenos como o HA da Influenza-A, a glicoproteína do TGE, um coronavírus patogênico para suínos e o vírus HSV-1, mas algumas capacidades características protetoras de substâncias assim obtidas mostraram não ser adequadas e outros não foram ainda avaliados.

2. Expressão de抗ígenos protetores em hospedeiro eucariótico, como levedura ou linhagem de células contínuas de mamíferos - Consegiu-se expressar o抗ígeno de superfície de hepatite B/HBsAG em leveduras, produzindo quantidades aparentemente adequadas para a escala comercial. A expressão foi conseguida pela "transfecção" da levedura de recombinante de levedura contendo gen de HBSAG. Também, conseguiu-se produzir quantidades apreciáveis de HBSAG em células COS (linhagem celular de macaco transformada pelo SV40) infectada com um recombinante SV40-HBsAG e em linhagem de célula de camundongo transformada pelo vírus papiloma de bovinos formando recombinante BPV-HBsAg. Uma proteína de superfície do HSV-1, gD, foi expressa em células de linhagem de ovário de hamster (CHO). O desenvolvimento de métodos extremamente sensíveis da detecção do DNA, celular ou viral, presentes na suspensão final do抗ígeno purificado, permitirão a utilização de células de linhagens tipo CHO ou COS e recombinantes com fragmentos de vírus tipo SV40, indutores de transformação celular, na produção de抗ígenos para vacinas.

3. Peptídeos sintéticos como imunógenos - Considerável esforço tem sido feito no sentido de produzir peptídeos sintéticos que representam os sítios抗ígenicos principais de diversos vírus, e na sua avaliação como imunógenos. Alguns exemplos nesta linha de pesquisa são: a. os peptídeos sintéticos do VP1 do vírus da febre aftosa; b. os peptídeos representando muitas regiões da hemaglutinina do vírus da Influenza, incluindo os sítios抗ígenicos principais simulando anticorpos que ligam as hemaglutininas; c. peptídeos HBsAg lineares contendo grupo a e subtipo dy; d. peptídeos representando os sítios抗ígenicos mais importantes do tipo 1 e tipo 3 do vírus da poliomielite. Embora esta abordagem tenha considerável potencial, devido a baixa antigenicidade dos peptídeos sintéticos obtidos, tem sido necessários utilizar adjuvante de Freund para potenciação da resposta imune destes peptídeos em animais. Como este adjuvante não pode ser utilizado em seres humanos, a avaliação clínica destes materiais terá que aguardar o desenvolvimento de adjuvante que seja aceitável para ser utilizado em seres humanos.

4. Mimetismo抗ígenico com anticorpo anti-idiotípico - O idiotípico de uma molécula de anticorpo está localizada sobre ou próximo do seu sítio de combinação com o抗ígeno. Os anticorpos contra estes sítios são designados anticorpos anti-idiotípicos (anti-id). Em algumas situações pensa-se utilizar o anti-id mimetizando a conformação do sítio抗ígenico do抗ígeno que induz a resposta抗ígenica original. Anti-id feito contra anticorpo HBsAg ou anticorpo da proteína do capsídeo S1 do reovírus induz uma resposta imune para estes抗ígenos virais. Anti-id pode também imprimir uma resposta de anticorpos para HBsAg. Estas observações sugerem que é possível de se imunizar contra doenças virais utilizando-se anti-id definidos, um produto que é livre de infeciosidade, proteína viral e ácido nucleico viral. A preparação de anti-id para uso em seres humanos será feito utilizando-se anticorpos monoclonais que para isso dever-se-á desenvolver técnicas para a remoção de todo DNA celular da preparação anti-id final.

b. Mutantes atenuados - A linha de trabalhos que utiliza mutantes atenuados direcionados à vacina de vírus vivos vem desenvolvendo as seguintes pesquisas:

1. Atenuação por reagrupamento de gens - Os vírus que possuem genomas segmentados, e que não se multiplicam bem em seres humanos ou primatas, é identificado ou produzido no laboratório. Subsequentemente, todos os seus gens, com exceção daqueles que codificam os principais抗ígenos protetores, são transferidos em um vírus reagrupante por reagrupamento de gens durante a co-infecção com um vírus humano virulento. Os gens que codificam os principais抗ígenos protetores são derivados do vírus original humano virulento. Vírus da Influenza-A que são restritos aos seres humanos como os da Influenza-A aviária mostram-se promissores como doadores de gens proteicos para serem utilizados em atenuações de vírus epidêmicos ou pandêmicos, da Influenza-A humano. O reagrupamento de gens do vírus Influenza-A assim constituído apresentou-se satisfatoriamente atenuado e imunogênico em indivíduos susceptíveis e parece reter fenótipo atenuado durante a replicação "in vitro". Uma abordagem similar está sendo utilizada para a atenuação do rotavírus, o agente etiológico principal de diarréias em crianças e muitas espécies animais.

2. Atenuação por eliminação do gen patogênico - Foi construído um mutante de HSV-1 sem um gen promotor (a), que mostra ser atenuado em animais de experimentação. Progressos também têm sido alcançados com vírus Influenza-A, que possui um genoma segmentado, de oito gens com cadeia simples de RNA separados e de polaridade negativa. Foi construída também a sequência completa de gens do vírus da Influenza contendo DNA clonado, por técnica de DNA recombinante. Quando inserido dentro de um vetor viral apropriado como o SV40, o DNA clonado é expresso em células eucarióticas como proteína funcional do vírus Influenza. Permanece ainda o problema da transferência da informação genética do DNA clonado de volta ao vírus infeccioso.

3. Vírus vacinais atenuado como vetor para antígeno protetor viral heterólogo - Utilizando-se a técnica DNA recombinante é possível inserir-se gens para o antígeno protetor viral dentro de um vírus heterólogo atenuado para seres humanos. O vírus vaccinia tem sido avaliado para ser utilizado como vetor atenuado. No mínimo, 22Kb do DNA exógeno podem ser inseridos dentro do vírus vaccinia, sem diminuir sua infectividade para cultura de células. Recombinante do vírus vaccinia tem induzido resistência significativa para HBV e vírus de Influenza-A em animais experimentais. O recombinante vaccinia-HBs Ag protege chimpanzés contra desafio com HBV, enquanto que o recombinante vaccinia Influenza-A protege hamster de inoculação intranasal de vírus Influenza-A.

4. Seleção de epitopes mutantes, com o uso de anticorpos monoclonais neutralizantes - Os mutantes atenuados são selecionados por anticorpos monoclonais específicos contra um epitope cuja conformação é crítica para virulência. A base de atenuação de mutante do vírus rábico parece ser a substituição de um aminoácido em um sítio específico dentro deste epitope. Infelizmente, o fenótipo atenuado não é estável, e da replicação destes mutantes em hospedeiros permissíveis, como o camundongo recém-nascido, emerge vírus rábico virulento. A atenuação do reovírus foi feita por seleção de vírus por anticorpos monoclonais com uma mutação afetando a função de adsorção da proteína de capsídeo S1. Esta atenuação parece ser estável e passagens seriadas "in vivo" não deram formação de vírus virulento.

Akira Horita
Fundação Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365
20000 Rio de Janeiro RJ

Cold Spring Harbor - Symposia on Quantitative Biology. I/II - Movable genetic elements. New York, Cold Spring Harbor, vol. 65, part. 1/2, 1025p., 1981. US\$ 62.40.

Embora "Elementos móveis" no genoma tenham sido descobertos nos anos 40, por Barbara McClintock, somente a partir dos anos 70 um maior número de laboratórios consagraram-se ao estudo de Sequências de Inserção (IS) e transposons. A descrição do fenômeno de transposição de sequências de DNA tem, desde então, mostrado ser um fenômeno geral em procariotos e em eucariotos, sendo responsável por vários mecanismos particulares de regulação da expressão gênica.

A generalidade da existência de elementos móveis nos genomas e a importância biológica deste mecanismo resultaram, em 1980, no tema central do famoso Simpósio de Cold Spring Harbor, abordado neste volume XLV, que é dividido em duas partes.

A primeira é consagrada à descrição de Elementos móveis em bactérias e em bactériofágos, sendo discutidas as propriedades gerais, estrutura e função de elementos transponíveis, assim como os mecanismos e os fatores que afetam a transposição.

Na segunda parte são descritos fenômenos de transposição em eucariotos, e, em vírus que transformam células eucarióticas. A discussão estende-se da instabilidade genética de plantas até a variação antigenica em tripanosomatídeos, passando pela descrição de elementos de transposição em *Drosophila* e em levedura e a importância dos mesmos na organização e evolução dos genomas de eucariotos. São apresentados também trabalhos sobre a organização e função de genes de eucariotos, notadamente no que concerne os genes que codificam as cadeias polipeptídicas das imunoglobulinas.

No volume XLV do Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology são apresentados 113 artigos de primeira linha sobre Elementos móveis, sendo que vários deles podendo ser considerados clássicos pela importância e generalidade dos fenômenos biológicos estudados e elucidados. Como característico dos volumes que compõem esta série, é de leitura extremamente interessante, sendo imprescindível a uma boa biblioteca de biologia e genética molecular.

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

2º Congresso Mundial Sobre Doenças Sexualmente Transmissíveis (D.S.T.), Paris, 25 a 28 Junho 1986. Palais Des Congres (Porte Maillot).

Sob o patrocínio da Organização Mundial da Saúde, será realizado o 2º Congresso Mundial sobre Doenças Sexualmente Transmissíveis, nos dias 25 a 28 de Junho de 1986, no Palais Des Congres (Porte Maillot) em Paris, França.

Dentre os vários temas abordados, destacam-se: Infecções urino-genitais causadas por chlamídias, germes piogênicos, micoplasmas e fungos; Infecções congênitas, perinatais, fetal, maternal, Complicações das infecções urino-genitais; Vírus papiloma; Herpes; Cytomegalovírus; Hepatite viral; AIDS, o vírus responsável e sua situação no mundo; Contracepção e doenças sexualmente transmissíveis: sua prevenção, resistência a antibióticos, componentes antigenicos, consequências econômicas e sociais, método de rápido diagnóstico e conclusões gerais.

Taxa de inscrição: Congressista: US\$ 295; Estudante: US\$ 100

Maiores informações:

I.C.A. Commissariat General

4, Villa d'Orléans 75014

Paris France

Tel. (1) 327.8000 Telex 206213

Edson Marden Bonifácio Souza
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP

14º Congresso Internacional de Microbiologia, Manchester/Inglaterra, setembro de 1986

Os eventos do congresso ocorrerão no Roscoe Building, Universidade de Manchester. Os simpósios abordarão tópicos como:

1. Bacteriologia-a. Sistemática (classificação dos grupos bacterianos; importância dos actinomicetos na indústria; impacto da taxonomia química na sistemática bacteriana, papel das homologias e sequência dos nucleotídeos; taxonomia da família das bactérias anaeróbias Gram-negativas); b. Industrial (métodos rápidos de detecção, identificação e enumeração de microrganismos; conversão orgânica de microrganismos refugados em relação a agricultura e a indústria alimentícia; processo e controle de fermentação; preservação de alimentos, avaliação de risco e microbiologia preditiva; cultura de células; seleção de microrganismos); c. Bioquímica (genética do metabolismo anaeróbio; arquibactérias; divisão e crescimento celular; bioquímica e genética de procariontes fotossintetizantes; integração da função metabólica da bactéria e sua regulação; papel dos componentes inorgânicos e elementos no metabolismo bacteriano; estrutura e funções da membrana bacteriana); d. Genética e biologia celular (replicação e divisão; organização e rearranjo no genoma de procariontes; avanços recentes nas técnicas de DNA recombinante; regulação e diferenciação genética; reparação e recombinação do DNA); e. Ecologia (ambientes oligotróficos, escala e gradientes em ecologia microbiana; ambientes térmicos; transferência do gene no ambiente natural; papel dos polímeros extracelulares em ecologia).
 2. Micologia - Regulação e expressão gênica; elementos de genética; micorriza; diferenciação multicelular; membranas fúngicas; diagnóstico e tratamento com pacientes portadores de imuno-supressão fúngica e princípios da cultura de fungos.
 3. Virologia - Vírus como vetores gênicos; recombinação e transposição; experimentos de multiplicação viral; detecção de partículas virais defectivas; genética molecular; novas vacinas virais; detecção e diagnóstico de doenças virais.
- O programa ainda está sujeito a modificações. Sugestões e recomendações poderão ser incluídos nos temas e enviadas a:

Prof. Stuart W. Glover
 Department of Genetics
 Ridley Building The University
 Claremont Place
 Newcastle Upon Tyne NE1 7 RU
 United Kingdom

Rosa Maria Tavares Andrade
 Sociedade Brasileira de Microbiologia
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 Cidade Universitária
 05508 São Paulo SP

Erlandsen, S.L. & Meyer, E.A., eds. - *Giardia and giardiasis: biology, pathogenesis, and epidemiology*. New York, Plenum Press, 407p., 1984. US\$ 65.00.

No prefácio os editores enfatizam que o propósito principal deste livro é o de comemorar o terceiro centenário da descoberta da *Giardia* por Leeuwenhoek, além da apresentação dos avanços realizados no conhecimento da *Giardia* e da giardiase. Com o advento de novas técnicas, como a microscopia eletrônica, a bioquímica, a imunoquímica, a cultura de tecidos e a fisiologia, um grande número de informações surgiram sobre a organização e características deste protozoário parasita e sua interação com o hospedeiro. O livro está dividido em três seções: I - Estrutura e fisiologia; II - Giardiase e III - Epidemiologia, escritas por uma expressiva lista de 30 autores. Na primeira seção o tema dominante é a biologia do organismo, com uma excelente discussão sobre a morfologia do trofozoíto e do cisto. Este texto é ilustrado com maravilhosas fotografias ao microscópio eletrônico de ultraestrutura e de varredura (SEM), as quais mostraram as principais diferenças morfológicas entre as espécies deste gênero. O metabolismo deste flagelado é apresentado no capítulo 3, e são descritos e discutidos os estudos realizados neste área, demonstrando a importância do bioquímismo celular deste flagelado. A seguir, no capítulo 4, são expostos os primeiros estudos realizados na detecção de isoenzimas e a sua aplicação no estudo taxonômico da *Giardia*. Nos capítulos 5 e 6 são apresentadas técnicas para o isolamento de trofozoítos e cistos e métodos para o cultivo "in vitro" de trofozoítos. Esta primeira seção termina com um estudo sobre a fisiologia da trofozoíto e

com a apresentação de um modelo para induzir o flagelado ao desencistamento. A segunda seção deste volume discorre sobre o diagnóstico e tratamento da giardíase. Nos capítulos sobre sintomas e tratamento é exposto que o mecanismo específico da patogenicidade da *G. lamblia* ainda não está bem esclarecido, como também não ficou elucidado porque certas pessoas apresentam uma fase aguda da doença e outras são virtualmente assintomáticas, existindo uma grande variabilidade em ambas situações clínicas. Entretanto as razões destas mudanças permanecem desconhecidas, mas os sintomas parecem ter uma correlação com transformações histológicas e enzimáticas do intestino delgado. Os trabalhos sobre a imunologia da giardíase apresentam uma preciosa coleção de novas informações para os estudiosos da imunoparasitologia. Estas investigações demonstraram que a proliferação dos trofozoitos de *Giardia* no intestino delgado induzem a produção de uma imunidade humoral e de uma resposta celular, que poderão ser detectadas no soro e nas secreções intestinais. Os autores discutem o exame parasitológico das fezes como o método de diagnóstico definitivo da giardíase, pelo encontro de trofozoitos e cistos. Entretanto, os testes sorológicos, como a imunofluorescência indireta (IFI), a imundifusão (ID), a enzimaimunoensaio (ELISA) e a eletroresinérésis (CIE), gradativamente tem se firmado como uma complementação do diagnóstico microscópico, não só nos exames de rotina, mas principalmente nos estudos epidemiológicos. Na terceira seção deste compêndio a proposta é o estudo da epidemiologia deste flagelado. Inicialmente são feitas considerações sobre a água potável como uma fonte de giardíase. Os vários autores dos capítulos apresentam trabalhos de pesquisa com o objetivo de detectar e remover da água potável os cistos de *Giardia*. As diferentes vias de transmissão são discutidas com profundidade e é dada uma visão geral dos diferentes animais que são os reservatórios e transmissores das diferentes espécies de *Giardia*, como também fica bem fundamentado que a principal via de transmissão é através dos alimentos contaminados com cistos. Os editores deste livro atingiram os seus objetivos, pelo seleto número de colaboradores que escreveram os 22 capítulos, além de brindarem os leitores com uma excelente revisão bibliográfica. O ponto forte deste livro foi trazer um melhor entendimento da *Giardia* como uma célula individual; da interação deste parásito flagelado com a mucosa do intestino delgado do hospedeiro; da produção da doença, e dos fatores que envolvem a epidemiologia da doença. Este excelente livro, deverá se constituir, por sua abrangência, em uma leitura obrigatória para grupos de pesquisa e um compêndio de consulta permanente pelos parasitologistas, biólogos, epidemiologistas, imunologistas e médicos.

Geraldo Attilio de Carli
 Faculdade de Farmácia UFRGS
 Disciplina de Análises Parasitológicas
 Av. Ipiranga, 2752
 90000 Porto Alegre RS

Gallo, R.C.; Essex, M.E.; Gross, L., eds. - Human T-cell leukemia/lymphoma virus; the family of human T-lymphotropic retroviruses: their role in malignancies and association with AIDS. New York, Cold Spring Harbor, 398p., 1984. \$60.00.

Neste livro, encontram-se resumidas as palestras e discussões de um encontro de especialistas, realizado em setembro de 1983 em Cold Spring Harbor. Os 106 pesquisadores participantes apresentam sua experiência no estudo dos retrovírus, associados aos linfomas e leucemias de linfócitos Timo-dependentes (HTLV), discutindo não apenas aspectos teóricos de grande relevância, mas também suas possíveis aplicações práticas.

Os capítulos iniciais abordam pesquisas básicas, versando o Cap. 1 sobre Modelos animais e Vírus relacionados, destacando similaridades entre os fenômenos associados às leucemias de linfócitos T em felinos, bovinos e seres humanos. No capítulo 2, são analisadas as propriedades bioquímicas e biológicas das proteínas centrais e da cápside, bem como dos ácidos nucleicos dos vírus HTLV, incluindo-se importantes estudos de clonagem molecular.

No capítulo 3, são apresentados estudos que avaliam os efeitos do HTLV sobre a biologia de linfócitos T, com emprego de receptores de superfície e caracterizações morfológicas através de anticorpos monoclonais.

Os capítulos finais são reservados às pesquisas aplicadas, encontrando-se, no Capítulo 4, estudos sobre a epidemiologia e história natural das moléstias relacionadas aos HTLV, com ênfase a estudos populacionais de leucemias e linfomas T em vários países. Finalmente, no capítulo 5, discutem-se possíveis correlações entre infecções por HTLV e a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

Os temas estudados são de interesse muito atual e as pesquisas apresentadas pregam os métodos mais modernos e adequados. Mesmo diante da heterogeneidade dos autores, quanto ao país de origem e formação profissional, o livro contém informações e discussões do mais alto nível, além da citação de grande número de referências bibliográficas atualizadas, devendo ser considerado de grande utilidade aos interessados em estudos acerca da participação de vírus no desenvolvimento de neoplasias.

Venâncio Avancini Ferreira Alves
Divisão de Patologia
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo, 355
Caixa Postal 7027
01000 São Paulo SP

Marchalonis, J.J., ed. - *Immunobiology of parasites and parasitic infections*. Vol. 12 - *Contemporary topics in immunobiology*. New York, Plenum Press, 497p., 1984. US\$ 59.50.

"Immunobiology of Parasites and Parasitic Infections", volume nº 12 da série "Contemporary topics in immunobiology" (Plenum Press, NY), é um lançamento de interesse para especialistas e estudantes de pós-graduação, nas áreas de imunologia, parasitologia, bioquímica e saúde pública. Vários pesquisadores, de projeção internacional, contribuem na preparação desta publicação, editada por J.J. Marchalonis. O livro abrange vários temas fundamentais da pesquisa imunoparasitológica e, salvo raras exceções, oferece uma visão prospectiva de suas principais tendências. A opção de incluir, nesta prestigiosa série, um volume especialmente dedicado à imunobiologia de parasitos, reflete a rápida evolução de conhecimentos nesta área e a enorme expectativa em torno de seu desenvolvimento. Reforçada pelo extraordinário progresso da biotecnologia (produção de anticorpos monoclonais, técnica do DNA-recombinante, etc.), a imunoparasitologia depara-se com francas perspectivas de exercer um expressivo papel no combate às infecções parasitárias de maior importância médica ou econômica/veterinária. Este fato se reflete na seleção dos tópicos deste livro, que resume recentes esforços na caracterização de抗原 protetores, em diversos sistemas. Luc Perrin & col. por exemplo, relatam o progresso já alcançado na análise da constituição antigenica do plasmódio, em diferentes estágios do seu ciclo de vida. Ainda sobre a malária, Russel Howard & John Barnwell concentram-se na caracterização dos抗原s de superfície, expressos na fase eritrocítica do ciclo de desenvolvimento, detalhando aspectos mecanísticos relacionados com o escape dos parasitos, à ação potencialmente citotóxica da resposta imune. Ainda sobre os mecanismos de evasão, os tripanossomas africanos revelam particularidades que justificam o entusiasmo que despertam entre imunologistas: Georges Roeland & Margaret Pinder resumem o estágio de conhecimento atual sobre o mecanismo de "variação antigenica" das glicoproteínas de superfície dos tripanossomas em seus aspectos bioquímicos e genéticos. Outras vias de escape foram detectadas na tripanossomiasi africana, a saber: ativação policlonal de linfócitos B, com possível exaustão do potencial reativo desta população linfocitária; hiperglobulinemia; e imunodepressão em intensidade variável.

A neutralização das respostas imunitárias assegura a viabilidade de uma carga parasitária mínima, nas infecções crônicas. Estes mecanismos representam um importante obstáculo à ação profilática ou terapêutica de vacinas contra infecções por metazoários ou protozoários. As diferentes estratégias utilizadas na vacinação expe-

rimental foram analisadas por Graham Mitchell, tomando como base seus estudos nos modelos murinos da Cistecercose, Giardiase, Nematodiose, Esquistossomose, e Leishmaniose cutânea. Neste último sistema, Mitchell e seus colaboradores australianos demonstraram elegantemente o crítico papel desempenhado por linfócitos T na determinação da resistência/susceptibilidade genética à infecção por *Leishmania tropica*. Nas linhagens de camundongos suscetíveis, as lesões cutâneas causadas por *L. tropica* progredem inexoravelmente devido à indução de células T supressoras específicas para抗igenos parasitários. A produção e análise funcional de clones de linfócitos T específicos para *L. tropica* ou também para *S. mansoni*, é descrita por Jacques Louis & col., um dos primeiros grupos a extender essa abordagem à pesquisa imunoparasitológica. Seus achados revelam que alguns destes clones promovem várias funções imunológicas. O mecanismo da resistência adquirida contra *L. tropica* não foi definitivamente estabelecido; uma das hipóteses mais favorecidas prevê a participação de T-linfocinas (interferona gama ?) na ativação de macrófagos, com a consequente indução de sua atividade microbicida, a nível intracelular. Fagócitos mononucleares são, reconhecidamente, capazes de prover uma ambiente favorável para a multiplicação de patógenos intracelulares, incluindo-se neste grupo diversos protozoários. Nádia Nogueira, em sua revisão sobre o assunto, descreve as evidências que apontam a participação de sistemas oxidativos na atividade parasitocida de macrófagos estimulados por T. linfocinas.

A relação dos fatores humorais e celulares implicados na resistência natural contra infecções parasitárias é muito numerosa, tornando difícil avaliar a contribuição relativa de cada elemento neste fenômeno tão fundamental. A exaustiva revisão de Joseph & Julia Albright reflete a natureza predominante fenomenológica deste complexo aspecto da relação parasito-hospedeiro.

Em oportuna revisão, Dean Befus & John Bienenstock identificaram as áreas de interface entre a imunologia, a parasitologia, e a fisiologia gastrointestinal neuroendócrina, estabelecendo sua relação com processos inflamatórios de base imunológica localizados nas superfícies mucosas. Em uma tentativa de apreciação conceitual do fenômeno imunopatológico na doença parasitária, Michael Philips & Eduard Fox compararam a Filariose, doença de etiologia complexa, provocada por vários nematódeos, com a esquistossomose, causada por trematódeos digenéticos. Ainda sobre a esquistossomose, sua complexa imunobiologia é reexaminada em capítulo separado por Raymond Damian. Completando essa extensa coletânea de textos em imunoparasitologia, Anthony Allison expõe argumentos a favor da ainda controvertida tese sobre a participação da imunidade celular na resistência contra a malária e a babesiose; Allison sustenta que os hemoparásitos são preferencialmente eliminados, no estágio intra-eritrocítico, pelo efeito de "stress" oxidativo induzido por reações de imunidade celular.

Concluindo, trata-se de uma publicação valiosa para profissionais e estudantes envolvidos com a imunoparasitologia, ou campos relacionados. Trata-se de uma leitura estimulante que deve ser recomendada sem hesitações.

Julio Scharfstein
Deptº de Imunologia
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Martin, G.W.; Alexopoulos, C.J. & Farr, M.L. - The genera of myxomycetes. Iowa, University of Iowa Press, 560p., 1983. US\$35.00.

Trata-se de uma revisão atualizada e simplificada (até nível de gênero, somente) da monografia The Myxomycetes, de Martin & Alexopoulos (1969).

Trabalho publicado no mesmo estilo, formato e papel da citada monografia, com a mesma excelente apresentação, com a reprodução integral de todas as estampas publicadas na monografia, fornecendo, assim, uma grande soma de informações que vão muito além do nível de gênero.

A parte introdutória, referente a ciclo de vida, morfologia, ciclo nuclear, fisiologia, observações sobre cultura em laboratório, ecologia, distribuição geográfica, e técnicas de coleta e herborização de espécimes, incluem dados das mais recentes pesquisas, atualizando informações obtidas nos anos que se seguiram à publicação da monografia (1969).

Na parte taxonômica há modificações diversas, que convém sejam mencionadas. Foi acrescentada uma subclasse - Stemonitomycetidae - compreendendo os organismos da ordem Stemonitales. Na ordem Liceales, a antiga família Reticulariaceae foi substituída por Enteridiaceae e o nome genérico *Reticularia* por *Enteridium*, por questão de prioridade nomenclatural. Os gêneros *Barbeyella* e *Clastoderma*, que na monografia estavam na família Stemonitaceae, da ordem Stemonitales, foram transferidos para uma família própria - Clastodermataceae - que foi colocada junto a Echinosteliaceae, na ordem Echinosteliales. O gênero *Minahatella*, que na monografia estava na família Dianemaceae, foi transferido para Trichiaceae. O gênero *Elaeomyxa*, que, na monografia, pertencia à família Stemonitaceae, foi colocado em família própria - Elaeomyxaceae - e transferido da ordem Stemonitales para Physarales. Na família Physaraceae foram feitas duas modificações básicas: a introdução, na chave, do gênero *Protophysarum* e a mudança do nome *Cienkowskia* (que estava preocupado) por *Willkommlengea*. A família Didymiaceae apresenta, também, algumas modificações: a inclusão do gênero *Viachea*, que na monografia estava colocado na família Stemonitaceae; inclusão do gênero *Trabrooksia* (proposta por Keller, em 1980); e a inclusão, na chave, e sem qualquer explicação do gênero *Leptoderma*, que, no mesmo trabalho, está incluído na família Stemonitaceae, da ordem Stemonitales (p.81), gerando, evidentemente, certa confusão. A subclasse Stemonitomycetidae é incluída no trabalho, contendo unicamente a ordem Stemonitales, com as famílias Schenellaceae e Stemonitaceae, sendo que a família Schenellaceae também é novidade, pela elevação do gênero *Schenella* (que na monografia pertence à família Stemonitaceae) à categoria de família. Na chave para gêneros de Stemonitaceae consta *Elaeomyxa* (because of its traditional classification in the Stemonitales), o que pode causar confusão, considerando que os autores colocaram o gênero em família própria - Elaeomyxaceae (p.62).

Considerando que a monografia (The Myxomycetes) de Martin & Alexopoulos (1969) é tida quase que como a bíblia dos especialistas e aficionados em mixomicetos, esta edição, como sua revisão atualizada e condensada (até nível de gênero), será, certamente, de valiosa utilidade para todos os que trabalham com esse grupo de organismos. Todavia, muitas das mudanças taxonômicas propostas (atrás citadas) são discutíveis e precisam ser tomadas com as devidas cautelas, principalmente tendo em vista os trabalhos dos especialistas europeus, liderados pela holandesa N.E. Nanenga-Bremekamp.

Para estudantes e especialistas cujo principal interesse taxonômico nos mixomicetos for apenas a identificação do gênero e sua posição nos táxons superiores, o trabalho é, no momento, insubstituível, e deverá fazer parte obrigatória das bibliotecas especializadas.

Alcides Ribeiro Teixeira
Chácara Botânica
Caixa Postal 85
13300 Itu SP

Simpósio e curso avançado em imunologia

A Yakult em associação com a SBI e o Deptº de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, patrocinará um simpósio e um curso avançado em imunologia a realizarem-se, respectivamente, nos dias 13 e 14 de fevereiro e de 15 a 21 de fevereiro de 1986. O simpósio será realizado em São Paulo, Capital, no Campus da USP e será coordenado pelo Prof. Dr. Wilmar Dias da Silva do ICB/USP. O curso será coordenado pelos Doutores Antonio Coutinho (Instituto Pasteur, Paris) e Susumu Tonegawa (Mass. Inst. Technology, Boston) e será realizado no Hotel Refúgio do Corsário na Praia de Fortaleza em Ubatuba, São Paulo. O simpósio será aberto a todos os interessados enquanto que o curso será destinado a 30 alunos a serem selecionados. A

relação de conferencistas é a seguinte: F. Alt (New York) - Rearrangement and expression of immunoglobulin heavy chain genes; J. Andersson (Uppsala) - Lymphocyte activation, growth and maturation; A. Augustin (Denver) - T lymphocyte repertoires; A. Coutinho (Paris) - Antibody repertoires: the physiology of autoreactivity; H. Eisen (Seattle/Paris) - Genetic basis for antigenic variation in African trypanosomes; W. Haas (Basel) - Somatic cell genetic analysis of neoplastic cells; T. Imanishi-Kari (Boston) - Antibody repertoire in heavy-chain transgenic mice; N. Jerne (Castillon-du-Gard) - The immune system; H. Ploegh (Amsterdam) - Human class I genes: structure, polymorphism and expression; S. Tonegawa (Boston) - The generation of immune diversity; N. Vaz (Paris/Belo Horizonte) - Organism-centered immunology.

Para maiores informações, dirigir-se ao Deptº de Imunologia, ICB/USP (Dr. Wilmar Dias da Silva - Coordenador), através do telefone: 212-7711 ramais 482 e/ou 506.

Súmula do 1º Encontro Informal sobre Leveduras

A Sociedade Brasileira de Microbiologia e o Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, promoveram o 1º Encontro Informal sobre Leveduras, no dia 24/6/85, no Edifício de Didáticas, Biomédicas II, USP, São Paulo SP.

Este 1º Encontro teve a participação de 71 especialistas da área, com representantes de São Paulo (Rio Claro, Araraquara, Ribeirão Preto, Botucatu, Campinas, Piracicaba e Pirassununga), Amazonas (Manaus), Espírito Santo (Vitória), Minas Gerais (Belo Horizonte e Viçosa), Paraná (Ponta Grossa), Paraíba (João Pessoa), Rio Grande do Sul (Rio Grande) e Chile.

O Prof. Dr. José A. N. Candeias e o Dr. João Salvador Furtado abriram o evento falando em nome, respectivamente do Departamento de Microbiologia do ICB/USP e da Sociedade Brasileira de Microbiologia.

No período matutino os participantes foram distribuídos em três grupos, de acordo com as áreas específicas, para a discussão de temas prioritários.

Para cada área foi escolhido um relator que apresentou os assuntos discutidos nos grupos, sendo, posteriormente, estabelecidas etapas efetivas a serem alcançadas. Proposições

Grupo da área médica = 30 participantes. Relator: Arlete E. Cury (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP):

1. Novo encontro do grupo médico, possivelmente em agosto deste ano, e encontro geral durante o Congresso de Microbiologia.
2. Convidar pesquisadores estrangeiros a fim de que sejam divulgadas tecnologias consideradas padronizadas.
3. Criação de centros de referência (manutenção de culturas e padronização de métodos para identificação).
4. Criação de bancos de dados (trabalhos na área e listagem dos profissionais).
5. Pesquisa de抗ígenos, visando diagnóstico rápido.
6. Novos métodos de diagnóstico e produção de "Kits" nacionais.
7. Estudo de modelos experimentais em animais de laboratório.
8. Cursos de especialização e pós-graduação.
9. Boletim Informativo sobre trabalhos e eventos.

Grupo da área Taxonomia/Ambiental/Alimentos = 13 participantes

Relator: Sânia Maria Taub (Instituto de Biociências, Unesp)

1. Padronização de amostragem para os vários ambientes.
2. Técnicas padronizadas para o isolamento de leveduras de diversos ambientes.
3. Estudo da manutenção de leveduras.
4. Criação de Centro de Culturas (Coleção de Culturas).
5. Maior entrosamento entre os pesquisadores e trocas de informações (Banco de dados).
6. Determinação de parâmetros que valorizem os resultados, para a extrapolação do ecossistema que está sendo estudado.
7. Novo encontro no Congresso de Microbiologia levando propostas concretas.

Grupo da área Industrial/Genética = 29 participantes

Relator: Alcides Serzedello (Instituto de Biociências, Unesp)

1. Reunião do pessoal interessado em fermentação alcoólica com apresentação de te-

mas centrais para serem amplamente discutidos.

2. Convidar pesquisadores do exterior que tenham ampla e comprovada experiência em fermentação. Foi sugerido o Dr. Stephan Oliver (Mass. University Institute of Science and Technology).

3. Coleção de culturas. Divulgar o que está acontecendo sobre este assunto na várias Secretarias de Estado, Institutos de pesquisas, universidades, fundações, etc.

Consenso geral de etapas efetivas a serem alcançadas e seus responsáveis

1. Nova reunião do grupo no próximo Congresso de Microbiologia (São Paulo).

Coordenação Geral: Claudete R. Paula Gandra (ICB/USP)

Coordenadores de área - Médica: Arlete E. Cury; - Industrial/Genética: Flávio Alterthum; Tax./Alim./Ambiental: José Santo Goldoni (F.C.A./Unesp)

2. Coleção de culturas: Centro de coleção de culturas com auxílio de entidades financeiradoras.

Coordenação: Adhemar Purchio (ICB/USP). Área Médica: Paulo S. Minami (Fac. Ciências Farmacêuticas-USP);

Taxonomia/Ambiental/Alimentos: Sânia Maria Tauk; Industrial/Genética: Henrique V. Amorim (Departamento de Química-Esalg) e Maria Regina Melo Cruz (IPT/SP).

3. Convidar pesquisadores estrangeiros para treinamento de pessoal e cursos, com auxílio de entidades financeiradoras. Área Médica - Nomes sugeridos: F.C. Odds (Inglaterra) - Contato: Olga F. Gompertz (EPM/SP) e Arlete E. Cury; Winner (EUA) - Contato: Paulo S. Minami e Maria José S.M. Gianinni (Faculdade Ciências Farmacêuticas Unesp); Ahearn (EUA) - Contato: Adhemar Purchio.

Industrial/Genética- Nome sugerido: Stephan Oliver (EUA) - Contato: Ana Clara S. Frascino (ICB/USP)

Ambiental/Taxonomia/Alimentos - Nome sugerido: Kreger van-Rij (Holanda) - Contato: Claudete R. Paula Gandra e Maria Walderez Szeszs (ICB/USP); Youn W. Han (EUA) - Contatos: José Santo Goldoni (F.C.A./Unesp).

4. Elaboração de um Boletim Informativo, com o apoio da S.B.M.

Coordenação Geral: Claudete R. Paula Gandra

Área Médica: Paulo S. Minami e Carmely Sampaio (Fac. Odontologia da U.F. Paraíba); Taxonomia/Alimentos/Ambiental: Fernando Carlos Pagnocca (Unesp); Industrial/Genética: Flávio Alterthum (ICB/USP)

5. Atividades em conjunto. Contatos entre os três grupos para elaboração de pesquisas comuns. No próximo encontro cada grupo levará as principais linhas de pesquisa.

Área Médica: Arlete E. Cury

Área Industrial/Genética: Flávio Alterthum

Área Taxonomia/Alimentos/Ambiental: Sânia Maria Tauk

Ainda nesse evento foram apresentados seminários sobre: "Estudos recentes sobre leveduras de interesse médico (Adhemar Purchio - ICB/USP); Aspectos atuais sobre a AIDS (César A. Migliorati - F.O./USP); Técnicas empregadas para a determinação de viabilidade de leveduras (Benedito Corrêa - ICB/USP); Candidose de mucosa oral (Esther G. Birnmann (F.O./USP) e Carmely Sampaio - F.O./U.F.Pb); Processos fermentativos por leveduras (Maria Regina Melo Cruz - IPT/SP) e Engenharia genética de *S. cerevisiae* (Ana Clara S. Frascino - ICB/USP).

Este 1º Encontro do grupo foi realmente gratificante e temos a certeza de que o mesmo será o primeiro de uma série de muitos outros frutíferos encontros. Esperamos ainda que o responsável de cada etapa leve avante a mesma, pois gostaríamos de ver nossos principais objetivos alcançados e, somente isto será conseguido, com o esforço de todos.

Endereço para correspondência:

Claudete R. Paula Gandra

Deptº de Microbiologia - ICB/USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cidade Universitária USP

05508 São Paulo SP

Fone: 210.4311 Ramal 270

Wicklow, D.T. & Carroll, G.C., eds. - *The fungal community: its organization and role in the ecosystem*. New York, Marcell Dekker, 855p., 1981. US\$ 127,50 + 15%.

Este livro é o resultado de uma série de trabalhos apresentados no 2º Congresso Internacional de Micologia em Tampa, Flórida (E.U.A., 1977). Inclui 41 contribuições organizadas em oito secções maiores. Estas secções constituem-se de: 1. Ecologia dos fungos e teoria ecológica (examinando o papel da ecologia dos fungos na geração de teorias ecológicas); 2. Populações, parâmetros ambientais e conceito de nicho (investigando a conceituação de nicho e o princípio da exclusão competitiva); 3. Organização de populações e comunidades (apresentando metodologia quantitativa para descrição de populações e comunidades); 4. Interações entre populações (indagando que interações podem ser usadas para compreender a estrutura das comunidades); 5. Desenvolvimento das comunidades (tratando da sucessão e de seu papel no conceito de comunidade); 6. Biomassa e produtividade nos ecossistemas (desenvolvendo abordagens quantitativas para determinar o papel dos fungos nos ecossistemas); 7. Fungos no ciclo de nutrientes (apresentando processos e interações entre fungos e plantas) e 8. Hifomicetos aquáticos (representando um exemplo de comunidade).

Entre as contribuições, há uma mistura de apresentações, isto é, resultados de pesquisas (grupo de dados) e trabalhos de revisão. Considerando o conjunto de contribuições, muitas são notáveis, outras adequadas e poucas não muito úteis. Em geral, a maioria das contribuições é muito boa, particularmente as que apresentam idéias e conceitos úteis como precedentes para interpretação de dados.

O livro tem alguns pontos fracos, mas também pontos fortes. Inicialmente consideremos os fracos. Primeiro, o leitor é imediatamente surpreendido pelo tipo de impressão, que dificulta a leitura. Segundo, o livro é muito extenso, provavelmente pelo uso de impressão inadequada. Algumas das secções (isto é, Biomassa e produtividade nos ecossistemas, Fungos no ciclo de nutrientes e Hifomicetos aquáticos) talvez pudessem ser omitidas, sem alterar o objetivo principal do livro. Terceiro - e mais importante - o conceito de comunidade não é apresentado, nem pelos editores, nem como resultado das contribuições. Este deveria ser o tema principal a ser enfatizado no livro. Há micologistas que têm dificuldade em aceitar a aplicação do conceito de comunidade ("sensu strictu") aos fungos. O reconhecimento de comunidades fúngicas requer um conhecimento antecipado de interações (estratégias), sucessão e atividades das espécies que, em muitos casos, não estão disponíveis. Por conseguinte, uma definição concreta de comunidade faz-se necessária.

Os pontos fortes do livro são encontrados em suas aspirações mais do que em seu objetivo (a definição de comunidade). Os editores acreditam que "por intermédio deste livro os micologistas podem aprender como interpretar seus dados". Para a maioria das contribuições deste livro, aceitamos esse ponto de vista. Também os editores estão interessados na interface dados micológicos-teoria ecológica e reconhecem, como muitos outros, a importância do uso da linguagem ecológica na ecologia dos fungos, a qual pode ser compreendida e usada por ecologistas em geral. Finalmente, alguns trabalhos apresentam idéias que podem ser usadas como precedentes necessários para interpretação de dados fundamentais.

Espera-se que este livro não seja um ponto final no desenvolvimento da terminologia ecológica e de teorias para os fungos (Pugh, G.J.F., *Mycologia*, 75:571-573, 1983). Acredita-se que o livro ofereça um forte estímulo para o desenvolvimento da ecologia dos fungos e para os micologistas, no sentido de encorajar o lançamento de hipóteses sobre o tema.

Rosely Ana Piccolo Grandi
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

& Tom Booth
Pesquisador Visitante
Instituto de Botânica

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

VOLUME 16 JANEIRO-MARÇO 1985 NÚMERO 1

	CONTEÚDO	CONTENTS
Sant'Anna, E.S. & Aquarone, E.	1 Influência da água de maceração de milho no crescimento de <i>Candida utilis</i> em licor sulfítico	<i>Influence of corn steep liquor on growth of Candida utilis in spent sulfite liquor</i>
Buck, N.; Gambale, V.; Gambale, W. & Paula, C.R.	9 Microbiota fúngica anemófila da cidade de Presidente Prudente, Estado de São Paulo, Brasil	<i>Airborne fungi of Presidente Prudente SP, Brazil</i>
Madeira, E.D.; Lima, F.W. de M.; Faria, A.C. de; Baldez, M.L. & Campos Neto, A.	15 Lise celular dependente de anticorpos de <i>Leishmania donovani</i> por células de sangue humano periférico	<i>Antibody-dependent cellular lysis of [³H]-labelled Leishmania donovani by human peripheral blood cells</i>
Gatti, M.S.V.; Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Brito, J.R.F. & Barcellos, D.E.S.N. de	21 Fatores de virulência em amostras de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênicas para suínos isoladas no Brasil	<i>Virulence factors present in strains of porcine enteropathogenic Escherichia coli isolated in Brazil</i>
Schocken-Iturrino, R.P.; Avila, F.A. de; Pineese, J.E. & Yokoya, F.	31 Surto de botulismo C em frangos no Estado de São Paulo, Brasil	<i>An outbreak of type C botulism in broiler chickens in São Paulo State, Brazil</i>
Ogassawara, S.; Benassi, S.; Jamra, L.M.F.; Leme, P.T.Z. & Hagiwara, M.K.	36 <i>Hammondia hammondi</i> nas fezes de gatos na cidade de São Paulo, Brasil	<i>Hammondia hammondi in the feces of cats in the city of São Paulo, Brazil</i>
Araújo, M.A. de; Uthida-Tanaka, A.M. & Castro, O.C.	41 <i>Staphylococcus aureus</i> . II - Prevalência em portadores saudáveis e pacientes com conjuntivite estafilococica	<i>Staphylococcus aureus. II - Occurrence in healthy carriers and patients with staphylococcal conjunctivitis</i>
Zebral, A.A.	46 Isolamento e caracterização de <i>Vibrio lactose-positivo</i> , de mexilhões da Baía da Guanabara, Estado do Rio de Janeiro	<i>Vibrio lactose-positive, from mussels of the Guanabara Bay, State of Rio de Janeiro</i>

Franco, B.D.G.M.; Guth, B.E.C. & Trabulsi, L.R.	49	Isolamento e característica de cepas de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica isoladas de alimentos	<i>Isolation and characteristic of enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> strains isolated from foods</i>
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	<i>Sensitivity to 10 antimicrobial agents was tested with 139 strains of <i>Salmonella</i>, belonging to 32 serotypes, isolated from meals of animal source</i>
Rodrigues, L.G. de M.; Whittington, W. & Greaves, W.L.	61	Método simplificado para o isolamento de <i>Chlamydia trachomatis</i> usando células em suspensão	<i>Simplified method for isolation of <i>Chlamydia trachomatis</i> using cells in suspension</i>
Nozawa, C.M. & Apostolov, K.	66	Insaturação de ácidos graxos C18 induzida pelo vírus <i>Vaccinia</i> em células vero	<i>Vaccinia virus-induced unsaturation of C18 fatty acids in vero cells</i>
Informação Técnico-Científica SBM	70		
La Iglesia, M.R. de	76	Apresentação dos novos conceitos de biodigestores para diminuição do tempo de retenção hidráulica	

VOLUME 16 ABRIL-JUNHO 1985 NÚMERO 2

		CONTEÚDO	CONTENTS
Santa Rosa, M.R. de	83	Ultraestrutura do vacúolo pulsátil de <i>Monodinium balbiani</i>	<i>Ultrastructure of the contractile vacuole in Monodinium balbiani</i>
Melo, S.M. de; Santos, P.E.B. & Fontenelle, M.I.G.	90	Surto de infecção hospitalar por <i>Serratia marcescens</i>	<i>Outbreak of hospital-acquired infection by <i>Serratia marcescens</i></i>
Martinez, M.B. & De Bonis, J.C.	93	Isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> em um portador assintomático	<i>Search <i>Yersinia enterocolitica</i> in healthy humans</i>
Queiroz, D.M. de M.; Mendes, E.N.; Cisalpino, E.O.; Peres, J.N. & Penna, F.J.	95	Frequência de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica em crianças com diarréia aguda e em controles, em Belo Horizonte	<i>Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> isolated from children with acute diarrhea, in Belo Horizonte</i>

Prieto, G.; Martinez, A. & Cepeda, I. de	101	Prevalencia y evolucion de la resistencia en <i>Shigella</i> aislada en Venezuela	<i>Prevalence and evolution of resistance in <i>Shigella</i> from Venezuela</i>
Costa, E.O. da; Coutinho, S.D.; Teixeira, C.M. & Cantagalo, P.	113	Dermatose por <i>Candida</i> <i>albicans</i> em cão	<i>Canine dermatosis by <i>Candida albicans</i></i>
Roehe, P.M.; Rodrigues, N.C.; Oliveira, S.J. de; Guizzardi, I.I. Barcellos, D.E.S.N. de; Vidor, T.; Oliveira, L.G. & Bangel, E.V.	117	Encefalomielite suína no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil	<i>Encephalomyocarditis virus (EMCV). in swine in the state of Rio Grande do Sul, Brazil</i>
Salgado, J.M.; Basso, L.C. & Silva, C.R.V. e	121	Toxicidade de isolados de <i>Diplodia maydis</i> (Berk) Sacc. e possíveis toxinas	<i>Toxicity of <i>Diplodia</i> <i>maydis</i> isolates</i>
Echeverrigaray, S. & Tavares, F.C.A.	127	Atividade da inulinase em leveduras e fermentações de extratos de <i>Helianthus</i> <i>tuberosus</i> L	<i>Inulinase activity in yeasts and direct fermentation of <i>H.</i> <i>tuberosus</i> extracts</i>
Ferraz, C.A.M; A quarone, E. & Krauter, M.	132	Efeito da luz e do pH no crescimento de <i>Spirulina</i> <i>maxima</i>	<i>Effect of light and pH on growth of <i>Spirulina</i> <i>maxima</i></i>
Cruz, M.R. de M.; Vairo, M.L.; Gambassi, D.M. & Alterthum, F.	138	Influência da penicilina V-ácida no controle das infecções bacterianas na fermentação alcoólica	<i>The influence of V-acid penicillin on the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation</i>
Srivastava, K.C.	143	Produção de álcool a partir de casca de soja: um estudo preliminar	<i>Production of alcohol from the soybean seed coat: a preliminary study</i>
Informação Técnico-Científica SBM	153		
Craveiro, A.M.	166	Produção de metano a partir de vinhaça	
Pohland, F.G.	171	Tecnologia de biogás nos Estados Unidos: uma revisão	<i>Biogas technology in the United States: an overview</i>

	CONTEÚDO	CONTENTS
Ferraz, C.A.M.; Aquarone, E.; Florenzano, G.; Balloni, W. & Tredici, M.	179 Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de <i>Spirulina</i> <i>maxima</i> . Parte I - Emprego do anidrido carbônico	Utilization of by-products from alcoholic fermentation industry to biomass production of <i>Spirulina</i> <i>maxima</i> . Part I - Use of the alcoholic fermentation gas
Tauk, S.M	188 Efeito da adição de nitrogênio e fósforo no crescimento de <i>Candida</i> <i>utilis</i> em suco de polpa de café	Effect of the addition of nitrogen and phosphorus on the growth of <i>Candida</i> <i>utilis</i> in coffee pulp juice
Dianese, J.C. & Santos, L.T.P. dos	195 Atividade pectolítica das patovares de <i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> que afetam a mandioca	Pectolytic activity of two pathovars of <i>Xanthomonas campestris</i> affecting cassavae
Attia, R.M.; Gamal, R.F. & Ahmed, S.H.	203 Cinética da proteinase ácida de <i>Aspergillus</i> <i>niger</i>	Kinetic behaviour of acid proteinase from <i>Aspergillus niger</i>
Gomes, M. de F.F.F. & Furlanetto, S.M.P.	211 Salmonelas em amostras de fígado bovino e avaliação da eficiência de meios de enriquecimento seletivo, tempo e temperatura de incubação no seu isolamento	Isolation of <i>Salmonella</i> from beef liver and evaluation of enrichment broths, time and temperature of incubation
Bianco, M.; Costa, S.O.P. da & Bonato, M.C.M.	222 Excreção de protease (gelatinase) como um caráter genético instável em <i>Proteus vulgaris</i>	Protease (Gelatinase) excretion as an unstable character in <i>Proteus</i> <i>vulgaris</i>
Serafim, M.B.; Colli, I.A.G. & Castro, A.F.P. de	224 Avaliação do teste de ELEK modificado, no preparo de espécimes, para detecção de enterotoxina termoestável (STA) de <i>Escherichia coli</i>	Evaluation of the modified ELEK test in the preparation of specimens for the detection of thermostable enterotoxins (STA) from <i>Escherichia</i> <i>coli</i>
Prieto, G.; Martinez, A.; Cepeda, I. de & Urribarri, L. de	226 Frecuencia etiológica de la shigelosis por especie y serotipo en Venezuela	Etiological frequency for species and serotypes of <i>Shigella</i> in Venezuela
Almeida, A.M.P. de; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B. de; Leal, C.L. & Almeida, C.R. de	232 Detecção da peste no Estado da Bahia, Brasil	Observations on plague foci in Bahia State, Brazil

Giugliano, L.G. & Giugliano, R.	234	Etiologia das diarréias agudas em Manaus: observações ambulatoriais e na comunidade	Etiology of acute diarrhoea in Manaus: comparison between outpatients and community cases
Watanabe, D.S.A.; Lopes, C.A. de M.; Decarlis, R.M.S.T.; Michelin, L.A. & Montelli, A.C.	240	Sorogrupos de <i>Escherichia coli</i> envolvidos em infecção urinária, em Botucatu SP	<i>Escherichia coli</i> serogroups involved in urinary-tract infection in Botucatu SP
Pereira, J.A.A.; Cotrim, P.B.S.R. & Suassuna, I.	245	Resistência a antibióticos e íons inorgânicos em <i>Klebsiella pneumoniae</i> de pacientes hospitalizados e não hospitalizados	Resistance of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolated from hospitalized and non-hospitalized patients to antibiotics and inorganic ions
Informação Técnico-Científica SBM	247		

VOLUME 16 OUTUBRO-DEZEMBRO 1985 NÚMERO 4

CONTEÚDO

- Frigo, S.M.
& Azevedo, J.L. de
- Asensi, M.D.
& Hofer, E.
- Rossi Jr., O.D.;
Nader FQ, A.
& Amaral, L.A. do
- Ponseca, L. de S.;
Silva, M.G. da
& Gontijo FQ, P.P.
- Barbosa, S.F.C.;
Adelino, M.G.F.;
Takeda, A.K.
& Umekita, L.F.
- 255 Influência de plasmídio R na frequência de mutação em *Escherichia coli*
- 260 Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos. I - Bacteriologia
- 269 Estudo comparativo entre os testes de coagulase e termonuclease na identificação do *Staphylococcus aureus*
- 272 Avaliação da eficiência do meio 7H10 com soro fetal bovino no crescimento de micobactérias do complexo *M. tuberculosis*
- 275 Pesquisa de imunocomplexos circulantes em pacientes com meningococcemia

CONTENTS

- Influence of an R plasmid in the mutation frequency in *Escherichia coli*
- Investigation of *Yersinia enterocolitica* in rheumatic human patients. I - Bacteriology
- Comparative study between the coagulase and thermonuclease tests in the identification of *S. aureus*
- Evaluation of the effectiveness of the 7H10 medium containing fetal bovine serum and dextrose on supporting the growth of the *M. tuberculosis* complex strains

Research of circulating immune complex in patients with meningococcemia

Almeida, A.M.P. de; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B. de; Nakazawa, M. & Almeida, C.R. de	280 Demonstraçao de atividade pestosa no foco da Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brasil) no período de 1983 a 1984, através de exames sorológicos em roedores	Detection of plague activity in the focus of the "Serra dos Órgãos" (Rio de Janeiro, Brasil) by serological examination of rodents during the period from 1983 to 1984
Ricci, L.C.; Marton, R.C.A.N. & Castro, A.F.P. de	282 Produção de hemolisina por amostras de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas de origem suína e sua influência nas reações de imunohemólise para a detecção da enterotoxina termo-lábil (LT)	Haemolysin production by enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> of porcine origin and its influence in hemolytic tests for thermolabile (LT) enterotoxin detection
Gruber, A.; Mós, E.N.; Durigon, E.L. & Noronha, A.M.B.	287 Prevalência de <i>Campylobacter jejuni</i> e <i>C. coli</i> em fezes normais e diarréicas de cães em São Paulo	Prevalence of <i>Campylobacter jejuni</i> and <i>C. coli</i> in normal and diarrhoeic faeces from dogs in São Paulo
Passos, F.M.L. & Passos, F.J.V.	290 Descrição e classificação de bactérias acéticas isoladas da fermentação do cacau, com base em uma análise numérica	Description and classification of acetic bacteria isolated from cacao fermentation based on the numerical analysis
Rosalem, P.L.; Tauk, S.M. & Santos, M.C.N. dos	299 Efeito da temperatura, pH, tempo de cultivo e nutrientes no crescimento de fungos imperfeitos em vinhaça	Effect of temperature, pH, time of cultivation and nutrients on the production of fungi imperfecti in distillery slops (vinasse)
Sant'Anna, E.S. & Aquarone, E.	305 Crescimento de <i>Candida utilis</i> em licor sulfítico (licor negro): experimento em fermentador	
Magaldi, C. & Montelli, A.C.	309 Curso de mecanismos de agressão e defesa	Course on Mechanisms of aggression and defense
Suassuna, I.	316 Testes de sensibilidade bacteriana aos antibióticos: o antibiograma	

Fotolitos e impressão



Avenida Borges, 64
Vila das Mercês São Paulo
Fone: 914-0233
CEP 04298

