

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 17 Número 3 Jul.-Set. 1986

Instruções aos autores

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

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

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

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual Biological Journals" (2.ª edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nan (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($m\mu$) e 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 Angströms (\AA ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Conselho Diretor	Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo
Diretor Executivo	João Salvador Furtado Instituto de Ciências Biomédicas USP Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo SP
Diretor Associado	Flávio Alterthum Instituto de Química — USP Caixa Postal 20780 01000 São Paulo SP
Assistente de Diretoria	Leila Vasconcellos Sociedade Brasileira de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo SP
Aquisição por não-membros	Assinatura anual para quatro números: 2 OTN'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.	



REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 17 JULHO-SETEMBRO 1986 NÚMERO 3
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 17(3)

CONTEÚDO

Bernardo Fº, M.; Pereira, J.A.A.; & Boasquevisque, E.M.	188	Marcação de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com tecnécio 99m: uma comunicação preliminar	CONTENTS <i>Labeling of Klebsiella pneumoniae with technetium-99m: a preliminary communication</i>
Schmidell, W.; & Menezes, J.R.G.	194	Influência da glicose na determinação da atividade da amiloglicosidase	<i>Glucose effect during the amyloglucosidase activity determination</i>
Takaki, M.; & Jordão, L.R.	201	Bomba autoclavável simples para uso microbiológico	<i>Simple autoclavable pump for microbiological use</i>
Thámas, E.M.; Fonseca, L. de S.; & Gontijo Fº, P.P.	203	Biotipagem de amostras do complexo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> isoladas de pacientes tuberculosos no Brasil	<i>Biotyping of <i>M. tuberculosis</i> complex strains isolated from tuberculous patients living in Brazil</i>
Costa, M.C.S.; Carvalho, M.A.R. de; Cisalpino, E.O.; & Damasceno, C.A.V.	208	Aspectos epidemiológicos de <i>Staphylococcus</i> isolados no Hospital das Clínicas UFMG. III - Pesquisa de termonuclease	<i>Epidemiological aspects of <i>Staphylococcus</i> isolated in a General Hospital in Belo Horizonte (Hospital das Clínicas - UFMG). III - Themonuclease production</i>
Almeida, P.F. de; Alves, F.S.F.; Santos, L. de F.; & Santa Rosa, J.	213	Levantamento de agentes bacterianos associados com doenças respiratórias em caprinos no nordeste do Brasil	<i>Survey of bacterial agents associated with respiratory diseases of goats in North Eastern, Brazil</i>
Leal, N.C.	216	Leptospirose em ratos, na cidade do Recife PE, Brasil	<i>Leptospirosis in rats from Recife PE, Brazil</i>
Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D.	220	<i>Yersinia enterocolitica:</i> isolamento concomitante de fezes de humanos e cão	<i>Yersinia enterocolitica:</i> concomitant isolation from humans and dog

PUBLICADA COM APOIO FINEP/CNPQ

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

Giorgi, W.; Genovez, M.E.; Porto, E.; & Heins, E.M.	225	Metrite purulenta em équa puro-sangue inglês por <i>Candida rugosa</i>	<i>Pyometra in a thoroughbred mare caused by Candida rugosa</i>
Schocken-Iturrino, R.P.; Ávila, F.A. de; Nader FQ, A. Rossi Jr., O.D.; & Martins, O.	228	Surto de intoxicação alimentar por <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Food-borne intoxication by Clostridium perfringens</i>
Hirooka, E.Y.; & Salzberg, S.P.C. de;	234	Efeito do íon ferro e da conalbumina no desenvolvimento e produção de proteínas extracelulares na linhagem <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> S-6	<i>Effect of iron and conalbumin on the development and extracellular proteins production by strain <i>Staphylococcus aureus</i> S-6</i>
Leite, C.Q.F.; Lacava, P. de M.; & Yokoya, F.	243	Identificação e enumeração rápidas de <i>Salmonella typhimurium</i> na clara e no ovo líquido, pela técnica de membrana filtrante	<i>Quick identification and enumeration of <i>Salmonella typhimurium</i> in egg white and liquid egg through the use of membrane filter technique</i>
Schoebitz, R.; Montes, L.; & Castro, R.	248	Estudio bacteriológico del queso de campo vendido en la ciudad de Valdivia (Chile)	<i>Bacteriological study of the farm cheese sold in the town of Valdivia (Chile)</i>
Tauk, S.M.	254	Efeito da concentração de açúcar total e aeração no crescimento de <i>Candida utilis</i> em suco de polpa de café	<i>Effect of concentration of total sugar and aeration in the culture media</i>
Barbosa, H.R.; Struckel, Y.N.F.; & Almeida FQ, R.C. de	264	Atividade de nitrogenase de <i>Beijerinckia dertxii</i> nitrato redutase negativa cultivada em meio livre de carbono orgânico	<i>Nitrogenase activity of a negative nitrate reductase <i>Beijerinckia</i> dertxii grown in a organic carbon less medium</i>
Giametti, J.; Brandão, S.C.C.; & Pinheiro, A.J.R.	270	Efeito de culturas lácticas selecionadas e temperatura de maturação no flavor do queijo Minas curado	<i>Effect of some selected lactic acid producing bacteria and the ripening temperature on the flavor characteristics of Minas cheese</i>
Informação Técnico-Científica SBM	282		
Silva, N.A. da	287	A experiência da implantação de biodigestores rurais no Brasil	

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

Cetesb - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
Coca-Cola Indústria 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. Quím. Farmacêutica Ltda.

LABELING OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE WITH TECHNETIUM-99M: A PRELIMINARY COMMUNICATION

Mario Bernardo Filho

Deptº de Ciências Fisiológicas
 Instituto de Biologia UERJ
 Av. 28 de Setembro, 87 - fundos/4º
 20551 Rio de Janeiro RJ, Brasil

José Augusto Adler Pereira

Deptº de Patologia e Laboratórios
 Faculdade de Ciências Médicas UERJ
 Av. 28 de Setembro, 87 - fundos/3º

& Edson Mendes Boasquevisque

Deptº de Patologia e Laboratórios
 Faculdade de Ciências Médicas UERJ

Summary

The labeling of *Klebsiella pneumoniae* with technetium-99m ($Tc-99m$) seems to depend on the stannous ion (Sn^{++}) concentration. Starting at 3 μ g/ml of this ion in the suspension fluid an uptake of $Tc-99m$ close to 90% was observed. The labeling is apparently strong, since the elution of $Tc-99m$, after incubation of the tagged culture, in a water-bath at 37°C for several hours, was very weak. The viability of the culture was unaltered after treatment with tin and $Tc-99m$.

Resumo

Marcação de Klebsiella pneumoniae com tecnécio 99m: uma comunicação preliminar

A marcação de culturas de *Klebsiella pneumoniae* com tecnécio 99m ($Tc-99m$) parece depender da presença do íon estanoso (Sn^{++}). A partir da concentração de 3 μ g/ml deste íon na suspensão bacteriana, foi observada a incorporação pela cultura de 90% da radioatividade presente no meio. A marcação pelo $Tc-99m$, nestas condições, parece ser forte, uma vez que, após incubação da cultura marcada em banho-maria a 37°C por várias horas, a eluição do radionuclídio foi muito pequena para as concentrações de Sn^{++} usadas. Outro aspecto relevante desta técnica de marcação é que a viabilidade da população bacteriana submetida ao tratamento com Sn^{++} e marcada com $Tc-99m$ não foi alterada.

Introduction

Several radionuclides have been used to label different biological structures. Carbon-14 (C-14) and tritium (H-3) have been incorporated in bacteria (8, 9) or mammalian cells (10, 11). Red blood cells (RBC) have been labeled with chromium-51 (Cr-51) and technetium-99m ($Tc-99m$) (4, 2). The physical characteristics and the easy availability of $Tc-99m$ favour its preference for biological purposes and for

nuclear medicine procedures as compared with C-14, H-3 and Cr-51. RBC labeled with Tc-99m have been obtained by "in vitro", "in vivo" and "in vitro/in vivo" techniques (3, 5, 6).

A modified technique (2) to label RBC with Tc-99m, using the stannous ion (Sn^{++}) as a reductor agent, was used to obtain a culture of *Klebsiella pneumoniae* labeled with this radionuclide. The Sn^{++} concentration, the stability of the labeling and the resulting effects of Sn^{++} and Tc-99m upon the viability of the bacterial culture are reported.

Material and Methods

Bacterial strain - A strain of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a purulent secretion of a patient at the Bacteriology Laboratory of Hospital Universitário Pedro Ernesto, of the Universidade do Estado do Rio de Janeiro, was used.

Culture media - The bacterial suspension was obtained from growth in a liquid medium (Brain Heart Broth, Merck). Brolacyn Agar (Merck) was used as the plating medium for colony enumeration and counting.

Radionuclide and measurement of the radioactivity - Tc-99m as sodium pertechnetate was obtained, at the moment of each experiment, from a ^{99}Mo - ^{99}Tc generator (IPEN-TEC, Brazil). Tc-99m activities were measured in an ionization chamber or in a well counter with NaI (Tl) crystal.

Reductor agent - Tin, as stannous chloride ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) was purchased from Pro-analysi, Brazil. The solutions were prepared, at the moment of each experiment, from a 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ stock solution.

All dilutions of SnCl_2 solutions and washings of the bacterial suspension were performed with physiological saline solution (NaCl 0.9%).

Labeling technique - 0.1ml was taken from a overnight culture and added to 10ml of fresh liquid medium. Cells were growth with aeration in an water bath at 37°C during four hours (4 hours). The culture was centrifuged $1.7 \times 10^4 \times g$ for 10min and washed. The bacterial pellet was resuspended in 10ml of saline solution. Aliquots of 2ml of this suspension were distributed in five vacuum tubes and to each one graded, 1ml of stannous solution was added in order to reach the concentrations of 0.3, 3, 30, 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, besides a control tube with no stannous salt. After incubation for 60min at 37°C, 0.5ml of Tc-99m solution, with an activity of 2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ (7.4kBq/ml) was added to the mixture. Incubation was maintained under the same conditions for 10min. The tubes were gently shaked during all the incubation period. After centrifugation ($1.7 \times 10^4 \times g$ for 25min) of the vacuum tubes, 200 μl of the supernatant were transferred to count tubes containing 1ml of distilled water. The bacterial pellet was resuspended in the original volume of saline solution and 200 μl were put in count tubes with 1ml of distilled water. The percentage of Tc-99m uptake by the bacterial cells was determined by dividing the activity in the bacterial samples by the added values of activities in the bacterial and the supernatant samples.

Stability of the labeling - The percentage of Tc-99m labeled bacteria was calculated several hours after labeling with samples mantained at 37°C, in water bath. The vacuum tubes with bacterial suspensions were centifuged ($1.7 \times 10^4 \times g$ for 25min) and divided in 200 μl of supernatant and bacterial suspension, as formerly described.

Bacterial viability - The culture concentration (number of cells/ml) labeled with Tc-99m was determined in the beginning of the experiment and after different times of incubation at 37°C, in water bath. After conveniently diluted, 0.1ml of the culture was plated on Brolacyn Agar, and the colony counts made after 18 hours. The survival fractions were calculated by dividing the final by the initial number of

cells. Total counting of cells was obtained by multiplication of the observed number of colony forming units by the dilution factor.

Turbidimetry was performed during the incubation period, using a medico-photometer (Dr. B. Lange, Berlin) with a blue filter (Blan-BG-12).

Figure 1 - Influence of Sn-concentration in the % ^{99m}Tc -activity in *Klebsiella pneumoniae*

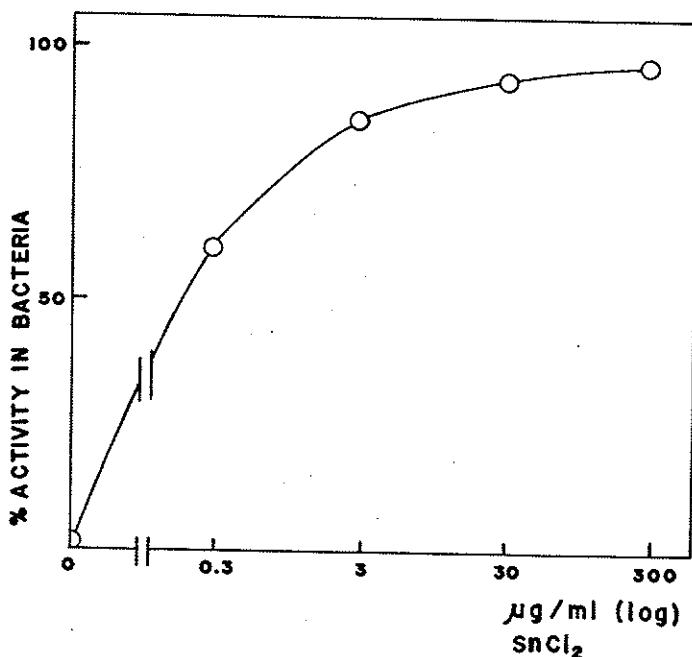


Table 1 - The effect of labeling in the viability of *Klebsiella pneumoniae*.

Symbols: A = Before incubation; B = After incubation at 37°C for 70min with saline solution; C = Same as B, with additional incubation for 24 hours at 37°C, after the labeling; D = After incubation at 37°C for 60min with saline and 10 min with Tc-99m; E = Same as D, with additional incubation for 24 hours at 37°C, after labeling; F = After incubation at 37°C for 60min with 1ml of SnCl_2 (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$); G = Same as F, with additional 10min with Tc-99m; H = Same as G, with additional 24 hours of incubation at 37°C

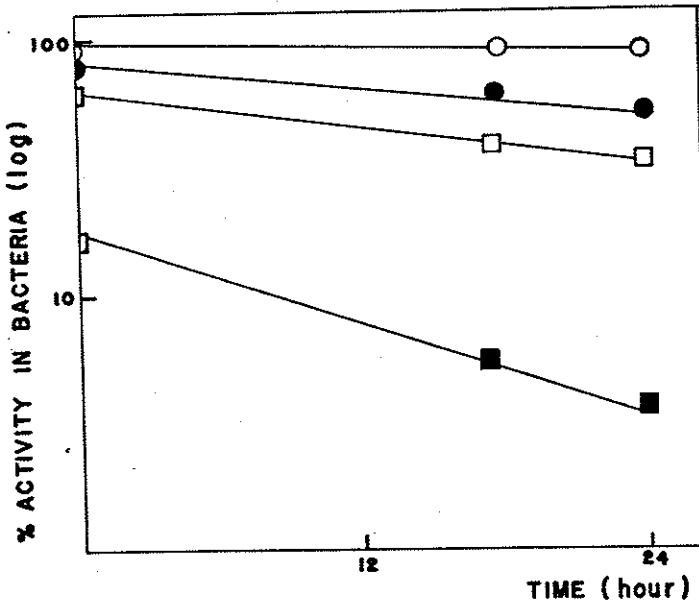
	A	B	C	D	E	F	G	H
Number of cell/ml	1.3×10^9	1.7×10^9	1.5×10^9	1.5×10^9	1.6×10^9	1.6×10^9	1.4×10^9	1.4×10^9
Viability index	1	1,30	1,15	1,15	1,23	1,23	1,08	1,08

Results

Figure 1 shows the percentage of Tc-99m uptake by *Klebsiella pneumoniae* cells treated with different concentrations of stannous chloride during 60 min at 37°C. Above 3 μ g/ml of SnCl₂ the curve reached a plateau with values close to 90%. At 30 μ g/ml the results were poor due to visible agglutination of the bacterial cells.

Figure 2 - Evaluation of % ^{99m}Tc-activity in bacteria as a function of time at 37°C.

Symbols: Sn-concentrations used: ■ 0, □ 0,3, ● 3 and ○ 30 μ g/ml



As the incorporation of Tc-99m by bacteria was high (Fig. 1), the stability of the fixation at 37°C was investigated for 24 hours. Figure 2 shows the percentage of incorporation of Tc-99m in the culture along incubation at 37°C. Elution was higher in the culture without treatment with stannous chloride and the lowest values were observed with 30 μ g/ml.

The effect of the labeling in the viability of the bacteria is shown in Table 1 which shows the survival of the untreated *Klebsiella pneumoniae* culture and of the same culture after treatment with 30 μ g/ml of SnCl₂ plus Tc-99m, both incubated for several hours in a water bath at 37°C.

Table 2 shows the results of turbidimetric measurements of the same cultures. The overall results show no significant modifications in the viability of the cells in the tested conditions.

Discussion

The results support the evidence that Tc-99m can be used to label bacterial cultures. The labeling is dependent of the stannous ion concentration (Figure 1). In the range of 3 to 30 μ g/ml of SnCl₂, a good uptake of Tc-99m by the bacterial cells was obtained. It is possible that activation by Sn⁺⁺ ions is necessary, as may be inferred from the low labeling found in the absence of tin. The

Table 2 - Cultures turbidimetry measurements.

Symbols: A = Before incubation; B = After incubation at 37°C for 70min with saline solution; C = Same as B, with additional incubation for 24 hours at 37°C, after the labeling; D = After incubation at 37°C for 60min with saline and 10min with Tc-99m; E = Same as D, with additional incubation for 24 hours at 37°C, after labeling; F = After incubation at 37°C for 60min with 1ml of SnCl₂ (30µg/ml); G = Same as F, with additional 10min with Tc-99m; H = Same as G, with additional 24 hours of incubation at 37°C

	A	B	C	D	E	F	G	H
Optical density	0.26	0.23	0.26	0.23	0.22	0.26	0.23	0.23
Variation (index)	1	0.88	1	0.88	0.85	1	0.88	0.88

agglutination observed at 300µg/ml may be due to the altered molarity of the medium.

Fixation of Tc-99m into the bacterial cells was apparently very strong, since its elution after several hours at 37°C in water bath was significantly low. The degree of elution was lowest at 30µg/ml of SnCl₂ and highest when SnCl₂ was not present (Figure 2). The need of tin for good labeling seems obvious from the referred data.

Another important characteristic of the described technique is that the survival fraction of the culture, at least as turbidimetrically followed is not substantially altered by the presence of stannous ion and Tc-99m. Such results are in agreement with experiments by Stathis & col. (1) who only observed growth inhibition of *Staphylococcus epidermidis*, when incubation was done with Tc-99m activities above 250mCi, and was not observed with 80mCi.

Since labeling of *Klebsiella* with Tc-99m gave satisfactory results, studies are under way aiming to characterize the pathways and the molecular level of fixation of this radionuclide to the bacteria.

This new technique became possible to obtain the labeling of a bacterial culture using a cheap and easily available radionuclide with several important physical characteristics (2, 6, 7). It is a gamma emitter with photon energy that can permit the study of the labeled culture both in "in vitro" and/or "in vivo" assays.

Acknowledgements

The authors are indebted to Dr. R. Alcantara Gomes and Dr. I. Suassuna for helpful criticisms and suggestions.

References

1. Stathis, V.J.; Miller, C.M.; Doerr, G.F.; Coffey, J.L. & Hladik, W.B. - Effect of technetium tc99m pertechnetate on bacterial survival in solution. An. J. Hosp. Pharm., 40:634-637, 1983.
2. Bernardo Filho, M.; Moura, I.N.S. & Boasquevisque, E.M. - 99mTechnetium-labeled red blood cells "in vitro". Arq. Biol. Tecnol., 26:455-461, 1983.
3. Armas, R.; Thakur, M.L. & Gottschalk, A. - A simple method of spleen imaging with 99mTc-labeled erythrocytes. Radiology, 132:215-216, 1979.
4. Pearson, H.A. - The binding of Cr⁵¹ to hemoglobin. I- In vitro studies. Blood, 22:218-230, 1963.

5. Pavel, D.G.; Zimmer, A.M. & Patterson, V.N. - In vivo labeling of red blood cells with ^{99}mTc : a new approach to blood pool visualization. *J. Nucl. Med.*, 18:305-308, 1977.
6. Smith, T.D. & Richards, P. - A simple kit for the preparation of ^{99}mTc -labeled red blood cells. *J. Nucl. Med.*, 17:126-132, 1976.
7. Linhart, N.; Bok, B.; Gougerot, M.; Gaillard, M.T. & Meignan, M. - ^{99}mTc -labelled human leukocytes: an in vitro functional study. *Acta haemat.*, 63:71-80, 1980.
8. Helmstetter, C.E. & Krajewski, C.A. - Initiation of chromosome replication in dna A and dna C mutants of *Escherichia coli* B/r F. *J. Bacteriol.*, 149:685-693, 1982.
9. Hooper, I.; Woods, W.H. & Egan, B. - Coliphage 186 replication is delayed when the host cell is UV irradiated before infection. *J. Virol.*, 40:341-349, 1981.
10. Cramer, P. & Painter, R.B. - Bleomycin: resistant DNA synthesis in ataxia telangiectasia cells. *Nature*, 291:671-672, 1981.
11. Blazek, E.R. & Hariharan, P.V. - Alkaline elution studies of hematoporphyrin derivative photosensitized DNA damage and repair in chinese hamster ovary cells. *Photochemistry and Photobiology*, 40:5-13, 1984.

INFLUÊNCIA DA GLICOSE NA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA AMILOGLICOSIDASE

Willibaldo Schmidell
 & João Ricardo Garcia Menezes

Escola Politécnica USP
 Deptº de Engenharia Química
 Caixa Postal 61548
 05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Há inibição da amiloglicosidase, quando se atinge 2g glicose/l no volume de reação. Este valor, além de sua importância no fenômeno de hidrólise, indica o cuidado a ser tomado na determinação da atividade. Para permitir uma estimativa mais real, foi proposta a correção de valores, caso o limite de 2g glicose/l seja ultrapassado.

Summary

Glucose effect during the amyloglucosidase activity determination

Product inhibition is present when glucose concentration reaches 2g/l in the reaction mixture. This value, important in the hydrolysis of starchy materials, also shows the care that we must take in the analytical procedure. In this case, a correction factor is proposed in order to have a better estimation of the real activity.

Introdução

O procedimento analítico para a quantificação de uma determinada enzima, é frequentemente realizada através da determinação da velocidade inicial da reação catalizada, ou seja, a determinação da atividade enzimática. Este procedimento pode ser dificultado pela inexistência de metodologia segura para a quantificação do produto final da reação.

No caso da amiloglicosidase, enzima responsável pela hidrólise do amido resultando glicose como produto final, este procedimento é relativamente simplificado pela existência de substrato e produto final estáveis e de fácil determinação.

Apesar deste fato, muitos dados, existentes na literatura, não são comparáveis, tendo em vista o uso de condições diferentes na determinação da atividade.

As condições utilizadas com maior frequência, para o ensaio padronizado, envolvem o emprego de soluções de amido solúvel com 40g/l, a pH = 4,2 e 60°C (6, 7). Entende-se que 40g/l significa excesso de substrato e as condições de pH e temperatura anunciadas como as que levam à maior velocidade inicial da reação.

Por outro lado, é bastante conhecida e frequente a ocorrência de inibição de uma enzima pelo produto final da reação, não sendo a amiloglicosidase exceção a esta regra (3, 4). Por este motivo muitos autores propõem a dosagem da atividade nas condições acima indicadas, porém sugerindo a necessidade de uma diluição conveniente da solução enzimática. Alternativamente, propõe-se a execução de ensaio com tempos variáveis, o que exige determinações da glicose ao longo do tempo, tendo

em vista a ausência, na literatura, de uma quantificação expressa da inibição pelo produto.

No presente trabalho, procurou-se conhecer a concentração de glicose necessária, para que o efeito sobre a amiloglicosidase seja possível de ser identificado, bem como tratou-se de propor uma correção, caso esta concentração venha a ser ultrapassada. O objetivo desta relação não reside numa proposta de correção definitiva, mas uma indicação mais aconselhável para, se possível, a repetição do teste.

Material e Métodos

Solução tampão acético (pH = 4,2) - A 600ml de água destilada juntávamos 57ml de ácido acético glacial. A seguir, ajustávamos o pH a 4,2 com solução de NaOH 2N e completávamos o volume a 1 litro.

Solução de amido a 4% - 40g de amido (E. Merck) eram suspensas em 600ml de água destilada fervente. Após fervura branda de 2 min., adicionávamos 60ml de tampão acético e completávamos o volume a 1 litro.

Soluções de amiloglicosidase - A enzima utilizada foi a amiloglicosidase para uso em laboratório, fornecida pela Sigma Chemical Co. Trata-se de glicoamilase oriunda de *Aspergillus oryzae*. Tal solução enzimática foi diluída através da adição de volume adequado (vide Tabela 1) do produto comercial em 250ml de solução tampão acético.

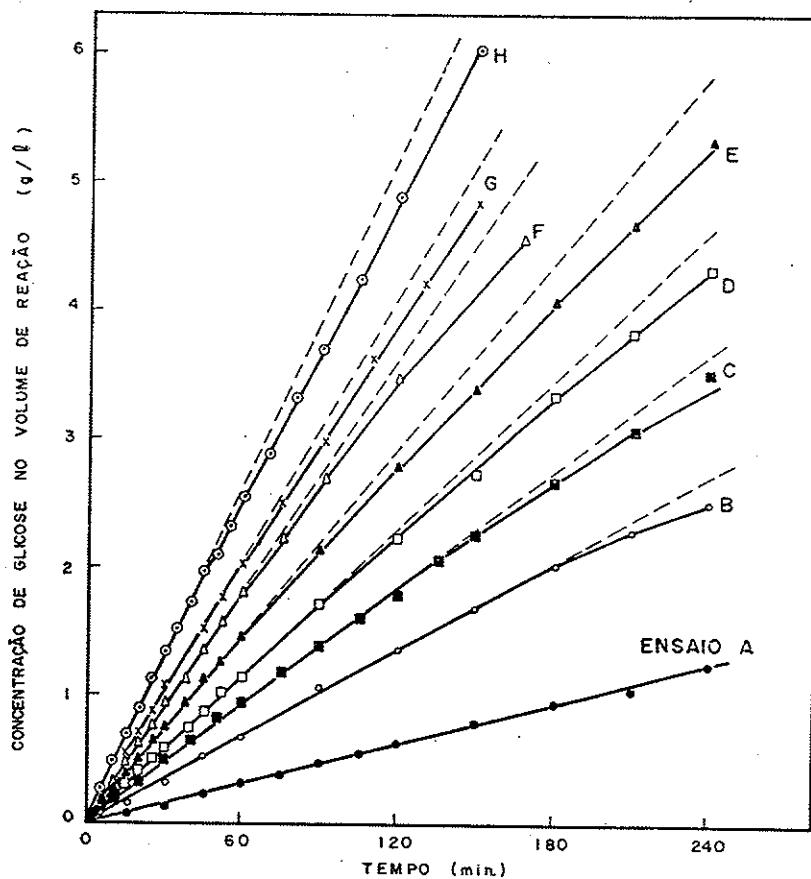
A fim de obter a variação da concentração de glicose em função do tempo, para

Tabela 1 - Ensaios realizados com diferentes diluições da amiloglicosidase Sigma, com indicação da regressão para o trecho linear considerado.

Símbolos: C = Indica a concentração de glicose no volume de reação; t = 0 tempo e CL = A concentração de glicose correspondente ao último ponto de regressão linear

Ensaio	Volume de sol. enz. comercial (ml)	Regressão linear (C em g/l, CL em g/l, t em min)	Coeficiente de correlação
A	0,03	C=-0,0041+0,0052t CL=1,25	0,9990
B	0,05	C=-0,0020+0,0113t CL=2,02	0,99990
C	0,08	C=0,0222+0,0151t CL=2,08	0,9993
D	0,10	C=0,0072+0,0192t CL=1,73	0,9998
E	0,13	C=0,0037+0,0245t CL=1,46	0,9998
F	0,17	C=-0,0040+0,0301t CL=1,79	0,9996
G	0,20	C=0,0101+0,0337t CL=2,02	0,9996
H	0,23	C=0,0135+0,0435t CL=1,98	0,9997

Figura 1 - Concentração de glicose no volume de reação em função do tempo para os vários ensaios



cada diluição da solução enzimática comercial, preparavam-se vários balões volumétricos de 50ml contendo 25ml da solução de amido solúvel, os quais eram deixados em um banho termostático (Ultra-Thermostat Gebruder Haake), a 60°C, até atingirem a temperatura indicada. Neste instante adicionávamos 1ml da solução enzimática diluída, cronometrando-se o tempo. Após certo intervalo de tempo, retirava-se do banho um balão volumétrico, procedendo-se à inativação de enzima por exposição do conteúdo do balão a um banho fervente por 5min.

Após resfriamento, completávamos o volume e determinávamos a glicose pelo método específico proposto para equipamentos Technicon Auto-Analyser (9), que utiliza a enzima hexoquinase. A determinação da concentração de açúcares redutores também foi realizada, em um ensaio (ensaio F), pelo emprego de ácido 2,3-dinitrossalicílico (DNS) (2). Neste caso, utilizou-se 1ml de amostra e 2ml da solução de DNS, em tubos de Folin-Woo para 25ml. O branco, para o ajuste da transmitância, foi realizado com 1ml de solução de amido solúvel a 40g/l. As curvas de calibração para ambos os métodos foram obtidas com soluções de glicose contendo 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0g/l.

Todos os resultados aqui apresentados referem-se a concentrações de glicose no volume de reação, ou seja, levando-se em conta a diluição efetuada de 26ml (volume de reação) para 50ml, antes das dosagens de glicose ou açúcares redutores.

Resultados

A variação da concentração de glicose em função do tempo para os oito ensaios realizados, ensaios estes caracterizados na Tabela 1, estão indicados na Figura 1.

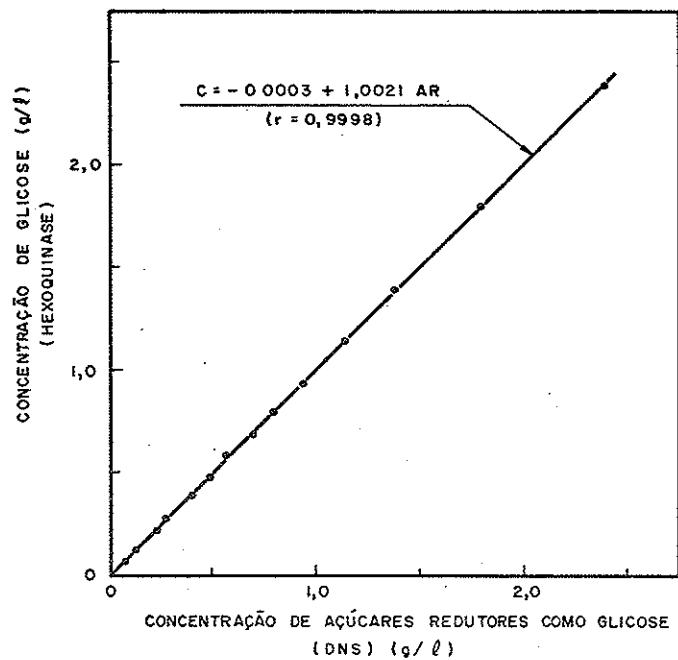
Nesta Figura indicamos por linhas cheias o trecho realmente linear, sendo as equações indicadas na Tabela 1. As linhas cheias, após o trecho linear, procuram seguir os pontos experimentais, enquanto as linhas tracejadas são a continuação da relação linear.

Para cada ensaio o término da relação linear foi obtido pela comparação de coeficientes angulares das equações das retas de regressão, incluindo inicialmente os três primeiros pontos (o ponto correspondente ao instante zero, com concentração nula de glicose, foi considerado) e acrescentando-se os pontos experimentais seguintes um a um. O trecho linear foi considerado terminado quando a inclusão de pontos subsequentes resultava num decréscimo sistemático do coeficiente angular. Na Tabela 1 indicamos, para cada ensaio, o valor da concentração de glicose para a qual termina a relação linear.

O critério acima mencionado foi suficiente para quase todos os ensaios, salvo para os ensaios C e G, para os quais o critério de observação visual nos pareceu mais apropriado e coerente com os demais. Isto significa que usamos critério misto, mas a Figura 1 não deixa margem a dúvida quanto à coerência na definição do instante final, para a consideração da relação linear.

Na Figura 2, indicamos os resultados obtidos para o ensaio F, para o qual determinou-se a concentração de glicose pelo método da hexoquinase e pelo DNS.

Figura 2 - Concentração de glicose (C) determinada pela hexoquinase em função da concentração de açúcares redutores como glicose (AR) determinada pelo DNS para o Ensaio F



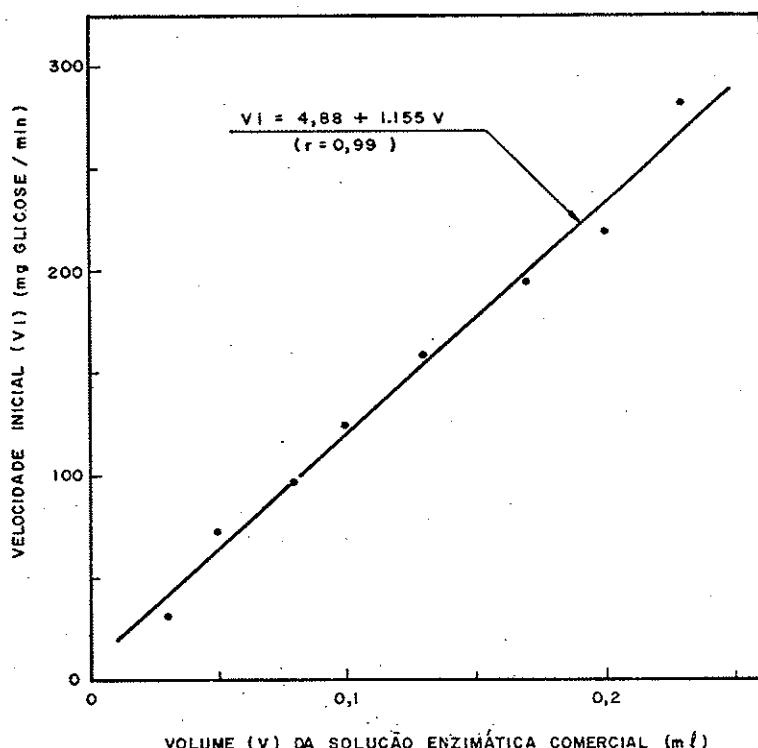
Discussão

A partir da Tabela 1 e, principalmente, da Figura 1, pode-se concluir que acima de 2g glicose/l, no volume de reação, ocorre desvio do comportamento linear que define a velocidade inicial da reação. Assim sendo, pode-se dizer que a partir desta concentração o efeito inibitório passa a ser perceptível nas condições empregadas.

O aparecimento de 2g glicose/l significa, estequiométricamente, o desaparecimento de 1,8g amido/l, ou seja, de 4,5% em relação ao amido inicialmente presente. Poder-se-ia imaginar uma influência sistemática da concentração reduzida de amido, motivo pelo qual uma das diluições de enzima comercial foi novamente ensaiada na presença de 35g amido/l. O resultado obtido foi praticamente coincidente, dentro das limitações experimentais, obtendo-se novamente trecho linear até 2g glicose/l.

O aparecimento da inibição pelo produto, para concentração tão reduzida, não deixa de ser notável quando se imagina a hidrólise prévia de amido para uma posterior fermentação alcoólica. Neste caso, parte-se de valores muito mais elevados, como 150 a 180g amido/l, chegando-se a valores da concentração de glicose igualmente elevados. O fato aqui apresentado reforçou a idéia, já corrente (8), de se efetuar a fermentação alcoólica simultânea à hidrólise, a fim de evitar este efeito inibitório.

Figura 3 - Relação entre a velocidade inicial de hidrólise (V_i) para cada ensaio e o volume de enzima utilizada (V)



Voltando ao método analítico de determinação da atividade enzimática, deve-se tomar como limite a concentração de 2 glicose/l, no volume de reação, e procurar diluir a solução enzimática de forma conveniente para que esta concentração não

seja atingida. Alternativamente pode-se diminuir o tempo do ensaio para atingir-se o mesmo objetivo.

Na Figura 3 indicamos a velocidade inicial obtida em cada ensaio (coeficientes angulares, indicados na Tabela 1, multiplicados pelo volume de reação) em função do correspondente volume do produto enzimático comercial utilizado. A relação linear obtida, com termo independente da grandeza desprezível, nos indica a ocorrência de proporcionalidade entre a velocidade e a concentração da enzima. Este fato nos revela a baixa relação entre quantidade de enzima e substrato, condição para que a proporcionalidade seja respeitada (1). A constante de proporcionalidade obtida é 1155mg glicose/ml.min, que nos fornece o valor da atividade do produto comercial, ou seja, 69300g glicose/l.h.

Ao analisar a Figura 2 fica bastante clara a possibilidade de se utilizar dosagem de açúcares redutores, desde que cuidados sejam tomados, com os descritos no item anterior.

Claro está quando se tem um produto comercial qualquer, cuja atividade enzimática seja desconhecida, ou determinada por outra metodologia, o procedimento experimental pode ser demorado e frequentemente cairíamos em concentrações de glicose superiores a 2g/l. Este é também o caso de ensaios de produção de glicoamilase, quando alterações de processo podem trazer surpresas na atividade do caldo (5).

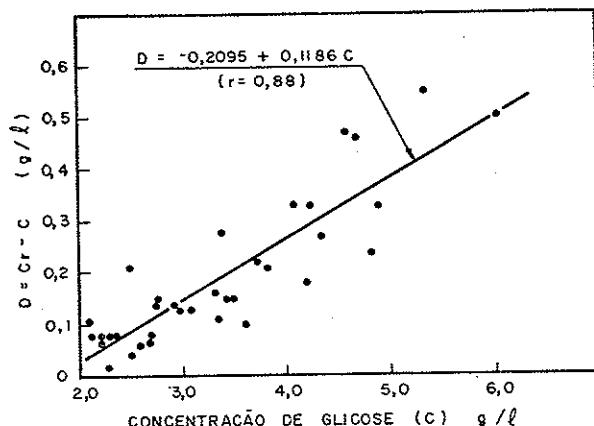
Por esta razão, procuramos determinar, a partir da Figura 1, para concentrações de glicose superiores a 2g/l, as diferenças entre os pontos experimentais obtidos e o valor da concentração de glicose que se obteria pela extrapolação da relação linear para aqueles instantes.

Com estes valores construímos a Figura 4, onde colocamos os desvios obtidos em função da concentração de glicose obtida no volume de reação (C). Conforme se pode observar há grande dispersão, como era de se esperar, mas mesmo assim podemos assumir uma distribuição ao longo de uma relação linear.

Considerando esta possibilidade, pode-se propor:
 $D = -0,2095 + 0,1186 C \quad (r = 0,88)$.

Esta equação é de evidente utilidade, pois uma vez obtido um valor acima de 2g/l, pode-se calcular o respectivo desvio a ser adicionado ao valor encontrado e, desta forma, contamos com uma melhor estimativa da atividade da solução em questão.

Figura 4 - Diferença (D) entre a concentração de glicose prevista pela relação linear obtida dos pontos iniciais (C_r) e o valor experimental (C), em função da concentração experimental



Referências Bibliográficas

1. Bailey, J.E. & Ollis, D.F. - Biochemical engineering fundamentals. New York, McGraw-Hill, 1977.
2. Bernfeld, P. - Amylases α and β . In: - Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds. - Methods in enzymology. New York, Academic Press, vol.1, p.149-150, 1955.
3. Beschkov, V.; Marc, A. & Engasser, J.M. - A kinetic model for the hydrolysis and synthesis of maltose, isomaltose, and maltotriose by glucoamylase. Biotech. and Bioeng., XXXI:22-26, 1984.

4. Kusunoki, K.; Kawakami, K.; Shiraishi, F.; Kato, K. & Kai, M. - A kinetic expression for hydrolysis of soluble starch by glucoamylase. Biotech. and Bioeng., XXIV:347-354, 1982.
5. Macedo, G.R. - Influência do pH e da temperatura na produção de amiloglicosidase por *Aspergillus niger* NRRL 337. Escola Politécnica da USP, 1982. (Dissertação de Mestrado).
6. Park, Y.K. & Lima, D.C. - Produção de amiloglicosidase fúngica por fermentação submersa e sua purificação. Rev. Bras. Tecol., 3:67-74, 1972.
7. Pfizer S.A. - Determinação de potência da amiloglicosidase pelo método A.U. Boletim Técnico BT-002/78, 1978.
8. Schmidell, W.; Aboutboul, H.; Facciotti, M.C.R. & Maeda, M. - Estudo de algumas variáveis na hidrólise e fermentação alcoólica de farinha de mandioca. Anais do VI Congresso Bras. Eng. Química, vol. II, 461-473, Unicamp (SP), julho/1984.
9. Technicon International Division - Clinical method glucose/hexokinase, Jan. 1976.

SIMPLE AUTOCLAVABLE PUMP FOR MICROBIOLOGICAL USE

Massanori Takaki
& Luiz Roberto Jordão

Deptº de Botânica UNESP
Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

Summary

Construction of a simple autoclavable pump with selective filtration using membrane filter with cheap available materials is described.

Resumo

Bomba autoclavável simples para uso microbiológico

A construção de uma bomba simples autoclavável com filtração seletiva usando filtro de membrana, com materiais baratos e disponíveis é descrita.

Introduction

The development and continuity of research of interest is limited by the difficulty of acquisition of equipments of laboratory, due to the continuous changes in the politic of finance of research. Since the import of those kind of equipments suffer an ancriterious selection by a minority who decide the kind of research which have to be carried out, we decided to construct our own necessary equipment using cheap materials available at any local shop.

Autoclavable supports for bacteriological filters have been made, previously, using PVC (polyvinyl chloride) connections (Jordão, L.R. & Takaki, M. - Simple and economic holders for the bacteriological filters. Arq. Biol. Tecnol., 28:457-490, 1985).

In the present paper the construction of an autoclavable pump for any purpose is described.

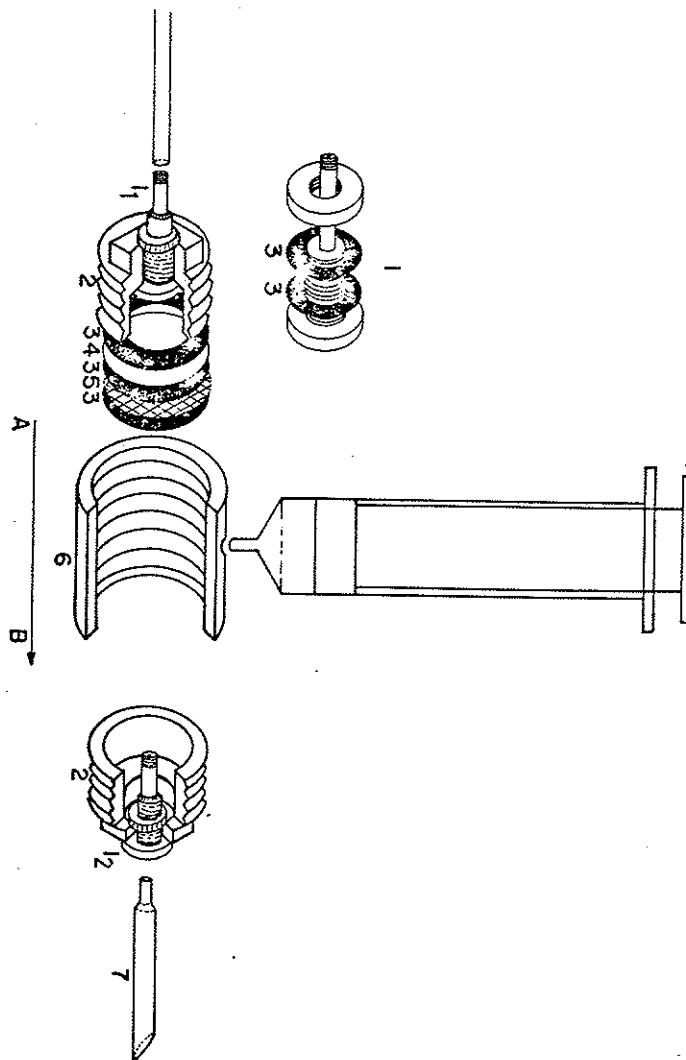
Material and Methods

PVC connections of 3/4 inches (Tigre, Brasil), vulcanized inner tube and inner tube valve of bicycle (B. Record, Italy) were purchased in a local shop. The pump autoclaved at 1 atm during 15 minutes, through which a liquid potato-dextrose medium was pumped. The medium was incubated at 30°C for one week.

Design of the pump - The Figure 1 shows the design of the pump using one 3/4 inches external union (6) and two thread end plugs (2). At each end plugs a valve (1) was connected using two rubber rings (3). A 4mm diameter hole was made at the 3/4 of the union where one syringe is connected. At the valve 1 one teflon tube is connected and at the valve 2 a piece of disposable 1cc syringe (7) is put at which a teflon tube can be connected. Pumping the syringe the liquid can be transferred from A to B. Between the two end plugs the membrane filter (4) and the grid (5)

Figure 1 - Design of the pump.

Symbols: 1₁ and 1₂. valve; 2. thread end plug; 3. rubber ring; 4. membrane filter; 5. grid; 6. external union and 7. piece of disposable 1cc syringe



spaced by rubber rings (3) can be put for selective filtration or pumping of non-autoclavable solutions.

Acknowledgement

M.T. supported by a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, 300992/81) fellowship.

BIOTIPAGEM DE AMOSTRAS DO COMPLEXO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* ISOLADAS DE PACIENTES TUBERCULOSOS NO BRASIL*

Edna Mello Thómas

Deptº de Microbiologia e Parasitologia
Instituto Biomédico
Universidade Federal Fluminense
Rua Ernani de Mello, 101
24000 Niterói RJ, Brasil

**Leila de Souza Fonseca
& Paulo Pinto Gontijo Filho**

Deptº de Microbiologia Médica
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - 2º andar - Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Isolamento e biotipagem de 165 amostras do complexo *M. tuberculosis*, a partir de pacientes com diagnóstico clínico de tuberculose e residentes nos Estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco e Amazonas. A maioria (80%) apresentou o comportamento do tipo humano clássico (*M. tuberculosis*). As restantes divergiram, em uma ou duas propriedades, da biovariante, apresentando características intermediárias entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, sem no entanto coincidir completamente com aquelas das variantes de *M. africanum*.

Summary

Biotyping of M. tuberculosis complex strains isolated from tuberculous patients living in Brazil

Isolation and biotyping of 165 strains of the *M. tuberculosis* complex from patients with presumptive clinical diagnosis of tuberculosis who have been living in Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco and Amazonas. Most of them (80%) behaved into classical human variant. The remainders diverged in one or two tests and appeared to be intermediate between *M. tuberculosis* and *M. bovis*, but without complete identity with African variants.

Introdução

O termo bacilo da tuberculose, por muitas décadas, designou, indistintamente, *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. avium*, em virtude da semelhança da doença que produzem.

* Trabalho realizado no Deptº de Microbiologia Médica, do Instituto de Microbiologia UFRJ, com recursos do CNPq, FINEP e CEPG-UFRJ.

Nos últimos anos, houve um notável avanço na taxonomia bacteriana, graças à introdução de técnicas para a avaliação dos ácidos nucleicos e a constituição química (quimiotaxonomia), além do emprego do computador na análise dos resultados laboratoriais (taxonomia numérica). Desta forma foi revelado o distante posicionamento de *M. avium*, em relação a *M. tuberculosis* e *M. bovis*, ao mesmo tempo em que as espécies *M. africanum*, *M. microti* e *M. bovis BCG* passaram a fazer parte do complexo *M. tuberculosis* (4, 5, 10).

Do ponto de vista antropocêntrico, o complexo *M. tuberculosis* refere-se, usualmente, apenas a *M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*, micobactérias comprovadamente patogênicas para o homem (3). Collins & col. (1) dividem o complexo *M. tuberculosis* em cinco variantes com distribuições geográficas distintas, a saber: variedade clássica humana, asiática, africana I, africana II e variedade clássica bovina.

Em face do desconhecimento da presença destas variedades em nosso meio, realizamos este trabalho no qual amostras provenientes de várias regiões do país foram biotipadas.

Material e Métodos

Foram estudadas 165 amostras isoladas de pacientes referidos como tuberculosos, procedentes dos seguintes Estados brasileiros: Rio de Janeiro (96 amostras) São Paulo (50 amostras), Pernambuco (14 amostras) e Amazonas (9 amostras). Adicionalmente, foram incluídas como controles as seguintes amostras: *M. tuberculosis* (IMC-107), *M. bovis* (IMC-401) e *M. bovis BCG* (Brasil).

Na caracterização do complexo *M. tuberculosis* foram utilizados os seguintes testes: ausência de crescimento a 25°C após 21 dias de incubação, inibição do crescimento pelo ácido para-nitrobenzóico (500µg/ml) e inibição do crescimento pela hidroxilamina (250µg/ml) (9). Na caracterização das variedades do complexo *M. tuberculosis* foram utilizados os seguintes testes: produção de niacina, redução de nitrato, estimulação do crescimento em meio de Loewenstein-Jensen pelo piruvato, crescimento em meio contendo ácido tiofénico 2-carboxílico TCH (5µg/ml); resistência a pirazinamida (60µg/ml) e cicloserina (30µg/ml); determinação do tipo respiratório, sensibilidade ao peróxido de hidrogênio a 0,02%; atividades pirazinamidásica, β-glicosidásica e ureásica (1, 2, 6, 8, 9).

Resultados e Discussão

Embora recebidas como bacilo da tuberculose, 4/169 amostras comportaram-se como atípicas, fato que demonstra a necessidade da identificação presuntiva das amostras isoladas de material clínico consideradas como *M. tuberculosis*. Ao analisarmos nossos dados encontramos que 133/165 amostras exibiram as características do biotipo humano clássico (*M. tuberculosis*). Os resultados encontrados nos diversos testes pelas amostras provenientes dos diferentes Estados (Tabela 2) mostram que 32 amostras diferiram em um ou mais resultados do comportamento esperado para este biotipo; as atividades β-glicosidásica (10 amostras) e pirazinamidásica (oito amostras) e o crescimento no meio com piruvato (sete amostras) foram as que mais variaram (Tabela 3).

O teste de sensibilidade ao peróxido de hidrogênio foi utilizado para separar o biotipo asiático do humano clássico, considerando que o primeiro é sensível a este agente, além de apresentar uma baixa virulência (Tabela 1) quando inoculado em cobaia (6).

Cento e trinta e três amostras foram identificadas como *M. tuberculosis* ou tipo humano clássico, enquanto as restantes (32 amostras) não corresponderam a esse biotipo. Entre as propriedades que divergiram do comportamento típico de *M. tuberculosis* merecem registro: o resultado negativo no teste da niacina (cinco amostras), classicamente considerado positivo em amostras do tipo humano clássico. No entanto, Tsukamura (7) encontrou uma porcentagem relativamente alta (32,3%) com este comportamento entre amostras provenientes de pacientes sob tratamento. Outros

Tabela 1 - Classificação do complexo *M. tuberculosis* em cinco biotipos importantes em patogenia humana^a.
Símbolos: a = Segundo Collins, Yates & Grange, 1982; PA/M = aerobiose/microaerofilia

Biotipos	Crescimento A/M ^b	Sensibilidade à		Redução do nitrato
		TCH (5µg/ml)	PZA (60µg/ml)	
Bovino clássico	M	S	R	-
Africano I	M	S	S	-
Africano II	M	S	S	+
Asiático	A	S	S	+
Humano clássico	A	R	S	+

Tabela 2 - Características exibidas pelas amostras do biotipo humano clássico (*M. tuberculosis*) isoladas de diferentes regiões brasileiras.

Símbolos: ^aNR = Teste não realizado

Características	Percentagem de resultados positivos em amostras provenientes				
	Rio de Janeiro	São Paulo	Pernambuco	Amazonas	Total
Crescimento em microaerofilia	11	0	0	0	7
Estimulação do crescimento pelo piruvato	0	0	0	0	0
Niacina	100	100	100	100	100
Nitrito	100	100	100	100	100
Sensibilidade a H ₂ O ₂	0	0	0	0	0
Urease	NR ^a	100	100	100	100
β-glicosidase	100	100	100	100	100
Pirazinamidase	100	100	100	100	100
Crescimento em presença de:					
TCH (5µg/ml)	100	100	100	100	100
PZA (60µg/ml)	12	29	30	0	17
CY (30µg/ml)	0	0	0	0	0

testes que forneceram resultados divergentes daqueles esperados para este biotipo foram: β-glicosidase (10 amostras), pirazinamidase (oito amostras), crescimento estimulado pelo piruvato (sete amostras), sensibilidade ao TCH (quatro amostras) e urease (seis amostras). Entre as 32 amostras não enquadradas no biotipo clássico humano, apenas 10 tiveram duas ou mais propriedades, divergindo do comportamento esperado para *M. tuberculosis*.

As variantes africanas (I e II) apresentam características intermediárias entre *M. tuberculosis* e *M. bovis* (Tabela 1). David & col. (2) verificaram, por taxonomia numérica, que estas amostras tendem a formar dois "clusters", um (G) relacionado ao tipo bovino, mais frequentemente encontrado na África Ocidental, e o outro (F) ao tipo humano, que é mais frequente nas regiões orientais daquele continente, formando um espectro contínuo de variação entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, não justificando a colocação de *M. africanum* como espécie definida.

Tabela 3 - Comparação do comportamento de 32 amostras que diferiram da variedade clássica humana (*M. tuberculosis*) com o de *M. africanum*.

Símbolos: a = Segundo David & col., 1978; b = Teste não realizado por David & col., 1978; c = Teste realizado com 5 μ g/ml de TCH

Características	Percentagem de resultados positivos		
	<i>M. africanum</i> ^a Cluster F	<i>M. africanum</i> ^a Cluster G	Nº de amostras estudadas
Crescimento em microaerofilia	26	87	3
Estimulação do crescimento pelo piruvato	48	100	21
Niacina	86	0	84
Nitrito	81	4	100
Sensibilidade a H ₂ O ₂	NR ^b	NR	100
Urease	95	26	81
β -glicosidase	43	1	68
Pirazinamidase	95	6	75
Crescimento em presença de:			
TCH (5 μ g/ml)	81	0	87 ^c
PZA (60 μ g/ml)	14	24	21
CYC (30 μ g/ml)	0	0	0

Nosso estudo constata esta situação, pois as 32 amostras, que deferiram do biotipo clássico humano em uma ou mais propriedades, com comportamento intermediário entre *M. tuberculosis* e *M. bovis*, poderiam ser consideradas *M. africanum*. No Brasil, ainda não foi relatado o isolamento de *M. africanum*. Entretanto, considerando-se a formação étnica de nossa população, este fato pode ser encarado como consequência de falta de estudo taxonômico das amostras definidas como *M. tuberculosis*. Consideramos, entretanto, prudente um estudo mais aprofundado destas amostras, antes de considerá-las *M. africanum*.

Embora o BCG seja utilizado como vacina na prevenção da tuberculose, a associação desta micobactéria com casos clínicos, particularmente em função do seu emprego como imunoestimulante em alguns países, está assumindo uma importância crescente (11). Assim, a possibilidade de seu isolamento foi considerada, sendo acrescentado aos testes para caracterização das variedades do complexo o de resistência a 30 μ g/ml de cicloserina que permite uma diferenciação do *M. bovis*.

Agradecimentos

Ao Instituto Adolfo Lutz, ao Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia, a Secretaria de Saúde do Estado de Pernambuco, ao Instituto Clemente Ferreira e ao Dr. Augusto da Costa Santiago pelo fornecimento de algumas das amostras estudadas.

Referências Bibliográficas

1. Collins, C.H.; Yates, M.D. & Grange, J.M. - Subdivision of *Mycobacterium tuberculosis* into five variants for epidemiological purpose: methods and

- nomenclature. J. Hyg. Camb., 89:235-242, 1982.
2. David, H.L.; Jahan, H.; Jumin, A.; Grandy, J. & Lehaman, E. - Numerical taxonomy analysis of *Mycobacterium africanum*. Int. J. Syst. Bacteriol., 28:467-472, 1978.
 3. David, H.L.; Brandes, E.; Casal-Roman, M.; Collins, L.H.; Groothuis, D.G.; Jenkins, P.A.; Magnusson, M.; Pattyn, S.R.; Schroder, K.H.; Thorel, M.F.; Wickman, K. & Yates, M.D. - Diagnostic and public health mycobacteriology. European Society of Mycobacteriologists, 1984.
 4. Goodfellow, M. & Wayne, L.G. - Taxonomy and nomenclature. In: - The biology of the mycobacteria. London, Academic Press, v.1, p.471-521, 1982.
 5. Runyon, E.H. - Mycobacteria: an overview. Rev. Infect. Dis., 3:819-821, 1981.
 6. Subbaiah, T.V.; Mitchison, D.A. & Selkon, J.B. - The susceptibility to hydrogen peroxide of Indian and British isoniazid-sensitive and isoniazid-resistant tubercle bacilli. Tubercle, 41:323-333, 1960.
 7. Tsukamura, M. - Niacin-negative *Mycobacterium tuberculosis*. Amer. Rev. Resp. Dis., 116:101-103, 1974.
 8. Wayne, L.G. - Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. Am. Rev. Resp. Dis., 109:147-151, 1974.
 9. Wayne, L.G.; Engel, H.W.B.; Grassi, C.; Grass, W.; Hawkins, J.; Jenkins, P.A.; Kappler, W.; Kleeberg, H.H.; Krasnow, I.; Nell, E.E.; Pattyn, S.R.; Richards, P.A.; Schowalter, S.; Slosank, M.; Szabo, I.; Tarnak, I.; Tsukamura, M.; Vergmann, B. & Wolinski, E. - Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for niacin and catalase and for resistance to isoniazid thiophene 2-carboxilic hidrazid hidroxylamine and p.nitrobenzoate. Int. J. Syst. Bacteriol., 26:311-318, 1976.
 10. Wayne, L.G. - Numerical taxonomy and cooperative studies: roles and limits. Rev. Infect. Dis., 3:822-828, 1981.
 11. Yates, M.D.; Collins, C.H. & Grange, J.M. - Differentiation of BCG from other variants of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from clinical material. Tubercle, 59:143-146, 1978.

ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DE STAPHYLOCOCCUS ISOLADOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS UFMG, III - PESQUISA DE TERMONUCLEASE*

Maria Cristina Soares Costa (Bolsista do CNPq)

Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Eduardo Osório Cisalpino

& Carlos Américo Veiga Damasceno

Deptº de Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Caixa Postal 2486

30161 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

Foram testadas 40 amostras de *S. aureus* (coagulase-positivas) e 17 de *S. epidermidis* (coagulase-negativas) isoladas de pacientes e servidores, de leitos e do ar do Hospital das Clínicas da UFMG, Belo Horizonte, através de um método simples para detectar nuclease termoestável ou termorresistente (TNase), pela técnica descrita por Lachica & col. (15), num estudo comparativo com os testes de coagulase em tubo e produção de DNase. Todas as amostras de *S. aureus* testadas apresentaram atividade de termonuclease e positividade nas provas de coagulase e DNase. Nenhuma amostra de *S. epidermidis* testada exibiu atividade de termonuclease, resultado concordante com as provas de coagulase e DNase. A correspondência entre os resultados do teste para nuclease termorresistente e as provas de coagulase em tubo e DNase confirma dados da literatura e o indica como medida simples para rotina de identificação de *S. aureus*, assim como para controle de qualidade daquelas provas.

Summary

Epidemiological aspects of Staphylococcus isolated in a General Hospital in Belo Horizonte (Hospital das Clínicas - UFMG). III- Thermonuclease production

A total of 57 strains of *S. aureus* and *S. epidermidis* (40 coagulase positive and 17 coagulase-negative) isolated from patients, professional staff and from the environment of a General Hospital in Belo Horizonte, Minas Gerais (Hospital das Clínicas da UFMG) were examined for thermonuclease (TNase) production by the agar diffusion, technique of Lachica & col. (15), and the results were compared with tube-coagulase and deoxyribonuclease (DNase) tests. All *S. aureus* strains were thermonuclease-positive, and none of *S. epidermidis* strains evidenced thermonuclease activity, corresponding both to coagulase and DNase tests. The excellent relationships among the three tests confirm literature data and suggest that the TNase test may be a

* Auxílio parcial do CNPq (Processo nº 401.408.180) e FINEP (Processo nº 43820629.00)

suitable one for routine identification of *S. aureus*, as for quality control measure.

Introdução

Os microrganismos da família *Micrococcaceae* podem ser agrupados em dois gêneros: *Staphylococcus* e *Micrococcus*, baseados em três características primordiais: na fermentação anaeróbica da glicose, utilizando-se um método padrão proposto pelo Subcomitê sobre Taxonomia de *Staphylococcus* e *Micrococcus*, considerado por alguns pesquisadores como pouco preciso; na proporção de guanina e citosina (CG) do ácido desoxirribonucleico, de metodologia pouco prática para uso na rotina de identificação e na susceptibilidade ao lisostafin que parece lisar, especificamente, estafilococos (16).

A maioria dos laboratórios clínicos depende inteiramente do teste de coagulase para distinguir *S. aureus* de outros microrganismos intimamente relacionados (3, 14, 15, 22, 26). No entanto, os resultados incorretos com o teste de coagulase podem levar a erros de identificação, às vezes indetectáveis, os quais trariam sérias implicações clínicas e epidemiológicas (3).

Por esses motivos, apesar do teste de coagulase ser ainda quase universalmente aceito como critério primário na identificação de *S. aureus*, outros produtos extracelulares desses microrganismos, como a lisozima e a nuclease, têm merecido atenção (1, 3, 5, 8, 11, 12, 16, 17, 18, 22).

Como parte da caracterização de estafilococos, isolados de pacientes e servidores, do ar e leitos do Hospital das Clínicas da UFMG de Belo Horizonte (6), foi realizado o teste de temnonuclease ou nuclease termoestável (TNase), pela técnica de Lachica & col. (15), num estudo comparativo com os testes de coagulase em tubo e produção de DNase.

Material e Métodos

Amostras - Foram estudadas 40 amostras de *Staphylococcus aureus* e 17 de *Staphylococcus epidermidis* isoladas, respectivamente, de pacientes (9 e 2), de servidores (5 e 4), de leitos (13 e 4), do ar (13 e 7) do Hospital das Clínicas da UFMG, no período de junho de 1980 a novembro de 1981.

Isolamento - As amostras foram coletadas e semeadas diretamente em placas de ágar manitol hipertônico, em duplicata, incubadas em aerobiose, a 37°C, e examinadas, após passagem em caldo nutritivo, quando necessário o reisolamento.

Caracterização sistemática - A identificação preliminar das amostras e o controle de pureza foram baseados no estudo das características tintoriais (Gram), seguindo-se as provas bioquímicas de produção de catalase, feita pelo método número dois de Cowan & Steel (7); oxidação e fermentação da glicose (teste O.F.) e fermentação aeróbica e anaeróbica do manitol, realizadas segundo o método padrão, recomendado pelo Subcomitê Internacional de *Staphylococcus* e *Micrococcus* (25); produção de coagulase, em tubo, utilizando-se a técnica de Ashcar (2) e produção de DNase realizada pela técnica descrita por Jeffries & col. (13), com modificações de Ashcar (2).

A detecção de temnonuclease pela técnica de Lachica & col. (15) foi feita inoculando-se uma colônia isolada de cada amostra em 0,5ml de caldo BHI. As amostras foram testadas quanto à produção da enzima, como se segue: após crescimento adequado no intervalo de tempo de 2 a 6 horas a 35°C, as culturas foram aquecidas a 100°C, por 15 minutos, retirando-se, antes do aquecimento, aliquotas de cada amostra para servir de controle.

Após resfriamento, com auxílio de micropipeta, aliquotas de aproximadamente 10µl de cada cultura foram colocadas nos orifícios das lâminas, tipo para imundifusão, adequadamente preparadas com 3,0ml do meio TB-DNA ágar (Toluidine Blue-Deoxyribonucleic Acid Agar), com a seguinte composição: 0,3g de DNA (Difco),

10,0g de ágar (Difco); 1,0ml de CaCl₂ 0,01M; 10,0g de NaCl e 3,0ml de azul de toluidina 0,1M em 1,0 litro de tampão TRIS 0,05M (pH 9,0).

As lâminas foram mantidas 1 a 4 horas a 35°C e, a seguir, observadas, detectando-se a presença da enzima temorresistente pelo aparecimento de um halo rosêo ao redor do orifício. A ausência do halo indicava teste negativo.

Como controles, utilizaram-se amostras padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, respectivamente, produtora e não produtora da enzima temorresistente.

Resultados e Discussão

As 40 amostras de *S. aureus* (pacientes 9; servidores 5; leitos 13 e ar 13) apresentaram resultados positivos nos testes de coagulase em tubo, DNase e TNase.

Em relação às 17 amostras de *S. epidermidis* isoladas (pacientes 2; servidores 4; leitos 4 e ar 7) nenhuma apresentou atividade de coagulase, DNase e TNase.

A habilidade de hidrolisar ácidos nucleicos tem sido observada em alguns microrganismos, por muitos pesquisadores (1, 3, 4, 9, 10, 13, 16, 23).

Em 1956, Cunningham & col. (9) descobriram a atividade da enzima nuclease e demonstraram sua grande resistência ao calor. Subsequentemente Lachica & Deibel (14) verificaram que quase todas as amostras de *S. aureus* produziram uma nuclease termoestável. Demonstraram também que, embora a atividade de nuclease possa ser encontrada em outros membros da família Micrococcaceae e em outros gêneros como *Pseudomonas*, *Serratia*, *Bacillus* e *Streptococcus* (14, 24), a produção de nuclease com estabilidade térmica parecia ser exclusiva dos *S. aureus*, observação esta corroborada por vários autores (15, 18, 20).

Entretanto, o teste de 832 amostras de 15 gêneros diferentes de *Staphylococcus* (19) revelou a produção de temonuclease por aproximadamente 9% das amostras de *Bacillus* e 19% de *Streptococcus*, indicando, contudo, que o tempo de aquecimento poderia ser usado para diferenciar temonucleases não estafilocócicas das estafilocócicas, usualmente mais termoestáveis. Além disso, a reação de catalase negativa para os estreptococos, a morfologia típica colonial e a coloração de Gram, contornariam uma incorreta identificação ao utilizar o teste de temonuclease, considerando-se os três gêneros citados (22).

O presente estudo demonstra a presença de nuclease termoestável em *S. aureus*, com todas as amostras testadas positivas para a produção da enzima, apresentando zonas de atividade, após 1 a 3 horas de incubação, fato que concorda com os resultados já encontrados (15).

Entre 68 amostras de *S. epidermidis* testadas (16), 50% produziram nucleases, manifestando suas atividades num período de incubação de 3 a 4 horas; nenhuma delas resistiu ao aquecimento por 15 minutos. Já foi demonstrada a produção de nuclease por 17% das amostras de estafilococos coagulase-negativos, uma das quais foi também temonuclease positiva (18) e 17% de produção de temonuclease em amostras de estafilococos, coagulase-negativos (19). Esses resultados diferem dos encontrados neste trabalho, onde não se verificou produção de nucleases entre as 17 amostras de *S. epidermidis* testadas.

Comparando-se com o teste de coagulase livre realizado, pode-se verificar que todas as amostras de *S. aureus* analisadas (positivas para temonuclease) foram também coagulase e DNase positivas, enquanto que nenhuma das amostras de *S. epidermidis* (negativas para enzima temorresistente) exibiu atividade de coagulase ou DNase.

Estes resultados confirmam dados da literatura nos quais os testes de coagulase e temonuclease são relativamente equivalentes como indicadores de *S. aureus* (3, 5, 18, 20, 22, 26), tornando-se desnecessário, na maioria das vezes, o uso de ambos na rotina. No entanto, devido ao fato de resultados falso-positivos ou falso-negativos não poderem ser detectados por apenas um teste, foi sugerido (3) que a realização dos dois testes, concomitantemente, poderia funcionar como medida de controle de qualidade, especialmente considerando-se a possibilidade da presença dessas enzimas em outros membros da família Micrococcaceae.

Essas observações se revestem de particular importância, sabendo-se que, embora

em raras ocasiões, *S. aureus* pode perder sua atividade de coagulase, retendo ainda sua toxigenicidade e potencial patogênico (16, 17). Isto poderia ser explicado pelo aparecimento de mutantes que perderam a habilidade de produzir a enzima ou pela possibilidade de reversão da reação, por produção de fibrinolisina pelas amostras, o que poderia falsear os resultados em função do momento da leitura do teste de coagulase (21).

Com relação ao meio de cultura utilizado (TB-DNA ágar), uma característica importante é a sua notável estabilidade, não sendo necessário esterilizá-lo, mesmo quando estocado por um período de mais de quatro meses. Esta estabilidade pode ser atribuída à propriedade inibitória do azul de toluidina (TB), em relação a algumas bactérias Grêm-positivas, especialmente às formadoras de esporos (15). Além disso, os autores disseram que os resultados são satisfatórios, mesmo quando o meio for aquecido por diversas vezes. A prova neste meio é bastante específica, desde que as enzimas temolábeis de *S. epidermidis* e *Micrococcus* sp. sejam preliminarmente inativadas (3).

A intensidade e rapidez de manifestações das reações positivas podem ser aprimoradas pela preparação adequada do inóculo. Assim, propôs-se (3) um inóculo mais denso, a partir de uma colônia isolada da amostra, transferida para um pequeno volume de caldo BHI, incubado por 2 a 6 horas, imediatamente antes da realização dos testes. Foi sugerido que este período curto de incubação em caldo BHI proporciona um inóculo mais denso e a produção das enzimas coagulase e nuclease, aumentando a intensidade e velocidade das reações positivas.

Tendo em vista os inúmeros componentes e produtos tóxicos, envolvidos na patogênese das infecções por *S. aureus*, sua reconhecida importância epidemiológica - que de forma crescente vem sendo atribuída a outros microrganismos do gênero, que podem apresentar alguns fatores de virulência comuns - e tendo em vista ainda a possibilidade já descrita de ocorrência de mutantes, a confirmação periódica da correspondência entre as principais provas indicadoras poderá representar uma garantia à confiabilidade das mesmas ou necessidade de utilização de novos parâmetros.

Referências Bibliográficas

1. Adekeye, J.D. - Reliability of thermonuclease production for the identification of human and animal *Staphylococcus aureus*. *Vet. Microbiol.*, 9:271-278, 1984.
2. Ashcar, H. - *Staphylococcus aureus*: avaliação das provas para sua identificação: diferenças de comportamento bioquímico entre amostras de origem humana e animal. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1969. (Tese de Doutoramento).
3. Barry, A.L.; Lachica, R.V.F. & Atchinson, F.W. - Identification of *Staphylococcus aureus* by simultaneous use of tube coagulase and thermonuclease tests. *Appl. Microbiol.*, 25:496-497, 1973.
4. Brandish, J.M. & Willis, A.T. - Observation on the coagulase and deoxyribonuclease tests for staphylococci. *J. Med. Lab. Technol.*, 27:355-358, 1970.
5. Castro, R. - Estudio comparativo de las pruebas bioquímicas empleadas para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 15:253-257, 1984.
6. Costa, M.C.S. - Aspectos epidemiológicos de *Staphylococcus* isolados no Hospital das Clínicas UFMG. Belo Horizonte, Depto. de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 1983. (Tese de Mestrado).
7. Cowan, S.T. & Steel, K.J. - Manual for identification of medical bacteria. Cambridge, University Press, 1965. Apud: - Aschar, H.-*Staphylococcus aureus*: avaliação de provas para sua identificação: diferenças de comportamento bioquímico entre amostras de origem humana e animal. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1969. (Tese de Doutoramento).
8. Cuatrecasas, P.; Fuchs, S.; Anfinsen, C.B. - Catalytic properties and specificity of the extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.*, 242:1541-1547, 1967.

9. Cunningham, L.; Catlin, B.W. & Privat de Garilhe, M. - A deoxyribonuclease of *Micrococcus pyogenes*. *J. Amer. Chem. Soc.*, 78:4642-4645, 1956.
10. Disalvo, J.W. - Deoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Tech. Bull.*, 9:191-196, 1958.
11. Grossgebauer, K.; Schmidt, B. & Langmaack, H. - Lysozyme production as an aid for identification of potentially pathogenic strains of staphylococci. *Appl. Microbiol.*, 16:1745-1747, 1968.
12. Jay, J.M. - Production of lysozyme by staphylococci and its correlation with three other extracellular substances. *J. Bacteriol.*, 91:1804-1810, 1966.
13. Jeffries, C.D.; Holtman, D.F. & Guse, D.G. - Rapid method for determining the activity of microorganisms on nucleic acids. *J. Bacteriol.*, 73:590-591, 1957.
14. Lachica, R.V.F. & Deibel, R.H. - Detection of nuclease activity in semisolid and broth cultures. *Appl. Microbiol.*, 18:174-176, 1969.
15. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971a.
16. Lachica, R.V.F.; Hoeprich, P.D. & Genigeorgis, C. - Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *Staphylococcus aureus* and other catalase-positive cocci. *Appl. Microbiol.*, 21:823-826, 1971b.
17. Lachica, R.V.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.
18. Menzies, R.E. - Comparison of coagulase deoxyribonuclease (DNase) and heat-stable tests for identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Pathol.*, 30:606-608, 1977.
19. Park, C.E.; Serrano, A.D.; Landgraf, M.; Huang, J.C.; Stankiewicz, Z. & Rayman, M.K. - A survey of microorganisms for thermonuclease production. *Can. J. Microbiol.*, 26:532-535, 1980.
20. Rayman, M.L.; Park, C.E.; Philpott, J. & Todd, E.C.D. - Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.*, 29:451-454, 1975.
21. Raymond, E.A. & Traub, W.H. - Identification of staphylococci isolated from clinical material. *Appl. Microbiol.*, 19:919-922, 1970.
22. Shanholtzer, C.J. & Peterson, L.R. - Clinical laboratory evaluation of the thermonuclease test. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 77:587-591, 1982.
23. Stikler, D.J. - Some observations on the staphylococcal deoxyribonuclease. *J. Med. Lab. Technol.*, 27:83-85, 1970.
24. Streitfeld, M.M.; Hoffmann, E.M. & Janklow, H.M. - Evaluation of extracellular deoxyribonuclease activity in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 84:77-80, 1962.
25. Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci - Recommendations of subcommittee. *Int. Bull. Nomen. Tax.*, 15:109-110, 1965. Apud: - Ashcar, H. - *Staphylococcus aureus*: avaliação de provas para sua identificação; diferenças de comportamento bioquímico entre amostras de origem humana e animal. São Paulo, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1969. (Tese de Doutoramento).
26. Woolfrey, B.F.; Lally, R.T. & Ederer, M.N. - An evaluation of three rapid coagglutination tests: sero-STAT^R, accu-StaphTM, and staphyloslideTM for differentiating *Staphylococcus aureus* from other species of staphylococci. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 81:345-348, 1984.

SURVEY OF BACTERIAL AGENTS ASSOCIATED WITH RESPIRATORY DISEASES OF GOATS IN NORTH EASTERN BRAZIL

Paulo Fernando de Almeida
Francisco Selmo Fernandes Alves
Lúcia de Fátima Santos
& Janete Santa Rosa

Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Caixa Postal D-10
62100 Sobral CE, Brasil

Summary

The etiology of respiratory diseases in ruminants is multifactorial. Stress, malnutrition, parasitism, as well as bacterial and viral agents are incriminated. The present study was carried out to conduct a survey of bacterial agents associated with respiratory diseases of goats in northeastern Brazil. Seventy-six lungs presented at necropsy showing gross pathologic lesions were studied using standard bacteriological techniques. The most commonly isolated bacteria was *Pasteurella haemolytica* (35,5%). The other bacteria isolated were: *C. pseudotuberculosis* (13,3%), *C. pyogenes* (7,9%), *Corynebacterium* sp. (6,6%), *Pasteurella* sp. (5,3%), *Pseudomonas* sp. (5,3%), *Staphylococcus* sp. (3,9%), *Streptococcus* sp. (2,6%), *P. mirabilis* (2,2%), *C. equi*, *S. faecalis*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Moraxella* sp., *P. multocida* and *E. coli* (1,3%). The prevalence of respiratory diseases was associated with some host characteristics, parasitism, as well as environmental and management factors.

Resumo

Levantamento de agentes bacterianos associados com doenças respiratórias em caprinos no nordeste do Brasil

A etiologia das doenças respiratórias em ruminantes é multifatorial. Stress, subnutrição, parasitismo, como também agentes bacterianos e virais são incriminados. O presente estudo foi conduzido para isolar e identificar os agentes bacterianos associados com doenças respiratórias em caprinos no nordeste do Brasil. Setenta e seis pulmões de caprinos, submetidos à necrópsia, apresentando lesões macroscópicas, foram estudados através de técnicas bacteriológicas padronizadas. A bactéria mais frequentemente isolada foi *Pasteurella haemolytica* (35,5%), seguida de *C. pseudotuberculosis* (13,3%), *C. pyogenes* (7,9%), *Corynebacterium* sp. (6,6%), *Pasteurella* sp. (5,3%), *Pseudomonas* sp. (5,3%), *Staphylococcus* sp. (3,9%), *Streptococcus* sp. (2,6%), *P. mirabilis* (2,2%), *C. equi*, *S. faecalis*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *Moraxella* sp., *P. multocida* e *E. coli* (1,3%). A prevalência das doenças respiratórias estava associada com algumas características do hospedeiro, parasitismo, bem como com fatores ambientais e de manejo.

Respiratory diseases cause considerable economic losses to goat production. The economic effects include mortalities, increased time to reach market weight, poor carcass composition, increased condemnation at slaughter, extra labor and costs for medication.

It is generally agreed that the etiology of respiratory diseases in ruminants is multifactorial. There are however a variety of microorganisms that have been consistently associated with pneumonia and their etiologic role cannot be disputed (Sharple, L.C.; Livingston, C.W. & Renshaw, H.W. - In: - Proc. 3rd Int. Conf. Goat Prod. Dis., Tucson 1982; Ojo, M.O., Vet. Bull., 47:573-578, 1977).

Analysis of post mortem records in Ceará during the last five years showed that respiratory diseases accounted for over 18% of the causes of mortalities in goats (Santa Rosa, J. - Personal communication). There are, however, few available data concerning the etiologic agents associated with these diseases in northeastern Brazil. This lack of fundamental knowledge curtails our ability to properly execute prophylactic and therapeutic measures.

This study is thus being conducted to identify both bacterial agents involved with respiratory diseases of goats and determine specific epizootiologic factors which are likely associated with the occurrence of these infections in northeastern Brazil.

Seventy-six specimens of lungs from goats presented at necropsy with a clinical history of pneumonia or showing gross pathological lesions were collected over an 12 months period, from the pathological unit of the Centro Nacional de Pesquisas de Caprinos in Sobral, CE, Brazil. Pneumonic lungs were sent to the bacteriology laboratory for bacterial isolations and identification.

Specimens were streaked on blood agar base (Difco) supplemented with 5% washed sheep erythrocytes, and on MacConkey agar (Difco). Plates were incubated aerobically at 37°C for 24 to 48 hours. Isolated bacteria were identified by standard diagnostic keys (Carter, G.R. - Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. 4.ed. Charles C. Thomas Publication, 1984).

The macroscopic evaluation of lungs showed a high incidence (26,8%) of respiratory diseases in goat herds of the Centro Nacional de Pesquisas de Caprinos.

Isolations were made from 72 (94,6%) lungs while the balance four (5,4%) were negative for aerobic bacteria. A wide variety of bacteria was isolated from lungs of goats with pneumonia. This is in accordance with the works of other authors (Ramachandran, S. & Sharma, G.L. - Indian Vet. J., 46:16-29, 1969). The most commonly isolated bacteria was *Pasteurella haemolytica* (35,5%). The incidence of such organisms in caprine pneumonia has been reported to be as high as 75,16% (Hordagoda, N.U.; Alwis, M.L.; Wettimuny, S.G.S.; Anthony, C.S.V.B. & Vipubarisi, A.A. - Ceylon Vet. J., 29:12-13, 1981).

Recovery of *C. pseudotuberculosis* (13,2%) and *C. pyogenes* (7,9%) from pneumonic lungs is in accordance with the works of other authors (Hordagoda, N.U., Ceylon Vet. J., 29:12-13, 1981; Ojo, M.O., Vet. Bull., 47:573-578, 1977). However, the occurrence of these organisms were not so sporadic as referred in the literature (Garg, D.N.; Nain, S.P.S. & Chandiramani, N.K. - Indian Vet. J., 62:805-808, 1985).

C. equi (1,3%) was isolated from a case of bronchopneumonia. This organism has also been reported to occur in caprine pneumonia (Withford, H.W. & Jones, L.P. - South west Vet., 27:261-262, 1974).

The other bacteria isolates were *Pasteurella* sp. (5,3%), *Pseudomonas* sp. (5,3%), *Staphylococcus* sp. (3,9%), *Streptococcus* sp. (2,6%), *P. mirabilis* (2,6%) *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp., *P. multocida*, *S. faecalis* and *E. coli* (1,3%). Most of these organisms have also been related in the literature as agents of pneumonia in goats (Abubakr, I.M.; Elfaki, E.M.; Abdalla, A.S. & Kamal, M.S., Bull. Anim. Hlth. Prod. Africa, 29:85-94, 1981; Sambyal, D.S.; Banerjee, M.; Baxi, K.K. & Gupta, P.P., Indian Vet. J., 17:89-91, 1980; Lloyd, S., Br. Vet. J., 138:70-85, 1982). However, the pathogenic significance of *Corynebacterium* sp. (6,6%) *Moraxella* sp. and *Klebsiella oxytoca* (1,3%), also isolated in this report, has not yet been established.

Although all of these organisms could play an important role in caprine pneumonia, it is generally thought that Chamydiae are the primary causes of many cases of these infections (Sharple & col., In: - Proc. 3rd Int. Conf. Prod. Dis.,

Tucson 1982).

The pattern of distribution of caprine pneumonia indicates a relationship between goat age, environmental conditions, nutrition as well as management and concurrents diseases, with the occurrence of caprine pneumonia. The prevalence of respiratory diseases was higher in young animals (less than 24 months old) and in goat above 4 years of age. The prevalence of these diseases was higher during rainy season and shortage food periods. Also, a correlation seems to exist between others diseases and caprine pneumonia. About 40% and 7,3% of the animals with pneumonia presented gastrintestinal parasitism and caseous lymphadenitis, respectively.

This report is thus in close agreement with findings of other investigators and re-affirm the view that bacterial pneumonia of goats results of complex interactions of various factors.

LEPTOSPIROSE EM RATOS, NA CIDADE DO RECIFE PE, BRASIL

Nilma Cintra Leal

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Fiocruz
 Campus da Universidade Federal de Pernambuco
 Av. Moraes Rego, s/n
 50000 Recife PE, Brasil

Resumo

De 50 cultivos microbianos, a partir de rins de 40 *Rattus norvegicus* e 10 *Rattus rattus* sp. (*R.r. alexandrinus* e *R.r. frugivorus*) capturados na cidade do Recife/PE em agosto de 1980, respectivamente 21(52,5%) e 2(20,0%) resultaram positivos para leptospira. A soroaglutinação microscópica revelou anticorpos antileptospíricos em 21(42,0%) animais, sendo o sorotipo *icterohaemorrhagiae* mais frequentemente aglutinado. Foi confirmada a maior frequência deste sorotipo na população humana. O alto percentual de culturas positivas e a frequência de anticorpos contra o sorotipo *icterohaemorrhagiae* encontrados em *Rattus norvegicus*, sugere a importância desse roedor na transmissão da leptospirose no Recife.

Summary

Leptospirosis in rats from Recife PE, Brazil

Out of 50 kidney cultures from 40 *Rattus norvegicus* and 10 *Rattus rattus* sp. (*R.r. alexandrinus* and *R.r. frugivorus*) caught in Recife (Pernambuco) Brazil, in August, 1980 respectively 21(52,5%) and 2(20,0%) were positive for leptospires. Antibodies were found in 21(42%) of these rodents, by microscopic agglutination. Serovar *icterohaemorrhagiae* was the most frequently agglutinant. As known this serovar is also the most frequent in city population. The high of rate positive cultures and antibodies anti *icterohaemorrhagiae* in the *Rattus norvegicus* suggests the transmission role played by this rodent in leptospirosis in the city of Recife.

Introdução

A importância dos ratos, na cadeia epidemiológica da leptospirose, já estudada em muitos países (4, 7, 9) ainda é pouco conhecida no Brasil.

Nóbrega (11) e Guida & Monici (6) relacionam os dados sobre a incidência de leptospira em ratos, fornecidos por diversos autores nos Estados do Rio Grande do Sul, São Paulo e Bahia.

Os trabalhos realizados com leptospirose na cidade do Recife, referem-se a epidemias ocorridas nos anos de 1966 e 1970, durante enchentes dos Rios Capibaribe e Beberibe (1, 5, 12, 13) além de um levantamento sorológico realizado em época endêmica (10).

As condições ambientais e hábitos populacionais no Recife, favorecem a proliferação dos roedores que poderão se infectar e eliminar a leptospira através da urina, constituindo um grande risco à saúde pública, sobretudo em épocas chuvosas, quando as águas contaminadas se espalham pela cidade.

O presente trabalho visou determinar os índices de infestação da população murina na cidade do Recife, através da pesquisa da leptospira e de anticorpos antileptospíricos.

Material e Métodos

Os animais foram obtidos por captura durante cinco dias distribuindo-se 122 armadilhas em locais propícios à proliferação de roedores, em 121 pontos de captura. Os roedores foram mantidos em quarentena por 48 horas, sendo classificados quanto à espécie, idade e sexo, com base nas medidas de cabeça + corpo, peso e observação das características de focinho e órgãos sexuais.

Foram selecionados 50 espécimes entre os de maior porte (2) com vistas ao isolamento de leptospires e reação para detecção de anticorpos antileptospíricos.

Para soroaglutinação microscópica (14), o sangue foi retirado por punção cardíaca com exposição direta do coração. O soro obtido foi acondicionado a -20°C até o processamento. Os sorotipos de leptospires utilizados como抗ígenos, nas reações foram: *icterohaemorrhagiae* cepas 3294 e RGA, *copenhagen* M20, *javanica* Veldrat Batavia 46, *canicola* Hond Utrecht, *castellonis* Castellon³, *pyrogenes* Salinem, *cynopteri* 3522C, *autumnalis* Akiyami A, sentot Sentot, *djasiman* Djasiman, *australis* Balllico, *pomona* Pomona, *grippotyphosa* Moskva V, *hebdomadis* Pasteur, *wolffii* Horto, *sejroe* M84, *saxkebing* Mus 24, *bataviae* Van Tienen, *tarassovi* Mitis Johnson, *panama* Cz 214 K, patoc Patoc I, andamana Corrêa.

O título aglutinante considerado positivo foi $\geq 1:100$.

Para isolamento das leptospires um rim de cada animal foi removido assepticamente, triturado em gral com areia lavada e estéril, feitas diluições a 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , em salina tamponada de Sorensen e semeado 0,1ml de cada diluição em 10ml de meio de Fletcher (Difco) enriquecido com 10% de soro de coelho (14).

Todos os meios foram incubados a 28°C e as culturas examinadas semanalmente, até oito semanas, entre lâmina e lâminula por microscopia de campo escuro, observando-se a presença ou ausência de leptospires.

Resultados

Em cinco dias, foram apreendidos 66 roedores, com 54,5% de captura, em relação ao número de ratoeiras.

Das 50 culturas realizadas com material de rim de 40 *R. norvegicus* e 10 *Rattus rattus* sp. (*Rattus r. alexandrinus* e *Rattus r. frugivorus*), respectivamente 21(52,5%) e 2(20,0%), estavam positivas para leptospira. Entre os *R. norvegicus*, dos 26 machos examinados 11(42,3%) e das 14 fêmeas 10(71,4%) tiveram cultura positiva para leptospira (Tabela 1). Em relação aos *R. rattus* sp., os 2(22,2%) animais com cultura positiva eram machos.

Dos 50 animais examinados, 21 foram reagentes a um ou mais sorotipos, com títulos variando de 1:100 a 1:3200. O fenômeno de coaglutinação foi observado em cinco soros assim distribuídos: três soros aglutinaram ao mesmo tempo com *icterohaemorrhagiae* 3294, *icterohaemorrhagiae* RGA e *copenhagen*. Um sorro com *icterohaemorrhagiae* 3294 e *pyrogenes* e outro com *canicola*, *sentot*, *djasiman*, *hebdomadis* e *wolffii*. Os sorotipos aglutinantes são mostrados na Tabela 2.

Os dois *Rattus rattus* sp. com culturas positivas também foram sorologicamente positivos para *icterohaemorrhagiae* com títulos variando de 1:200 a 1:800 com RGA e 1:400 e 1:3200 cepa nativa do Brasil, 3294.

Quanto a *R. norvegicus* foi observado que; dos 40 examinados, 17(42,5%) foram positivos por cultura e exames sorológicos 4(10,0%) só por cultura e 2(5,0%) apenas sorologicamente.

Discussão

A apreensão de *R. norvegicus* em maior número do que de *Rattus rattus* sp. (*Rattus*

r. alexandrinus e *Rattus r. frugivorus*) é resultante da metodologia adotada na captura orientada principalmente para os biótopos da primeira espécie. *Rattus rattus* sp. só foram ocasionalmente aprisionados.

Por outro lado, o fato de que tenha sido capturado um número mais elevado de ratos machos do que de fêmeas, encontra explicação nas diferenças de comportamento relacionados ao sexo nesses animais, observadas por outros autores, segundo os quais os ratos machos são mais ativos que as fêmeas (9).

Tabela 1 - Distribuição de roedores capturados e examinados, por espécie e sexo e cultura positiva para leptospira. Recife, agosto de 1980

Espécie	Sexo			Machos			Fêmeas			Total		
	Capt.	Exam.	Posit. (%)	Capt.	Exam.	Posit. (%)	Capt.	Exam.	Posit. (%)	Capt.	Exam.	Posit. (%)
<i>Rattus norvegicus</i>	27	26	11 (42,3)	16	14	10 (71,4)	43	40	21 (52,5)			
<i>Rattus rattus</i> sp.	17	9	2 (22,2)	6	1	0 (-)	23	10	2 (20,0)			
Total	44	35	13 (37,1)	22	15	10 (66,7)	66	50	23 (46,0)			

Tabela 2 - Títulos aglutinantes anti-leptospira em 50 soros de roedores, de acordo com o sorotipo. Recife/PE, agosto, 1980.

Símbolos: () = Indica o número de soros que coaglutinou com a *icterohaemorrhagiae*; (*) = Um soro que coaglutinou com 4 sorotipos

Sorotipos	Cepas de referência	Cepas de referência					
		1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200
<i>icterohaemorrhagiae</i>	3294	3	7	7	1	1	1
<i>icterohaemorrhagiae</i>	RGA	2	4	2	1		
<i>copenhageni</i>	M20	1(1)	2(2)				
<i>canicola</i>	Hond Utrecht		1(*)				
<i>pyrogenes</i>	Salinem		1(1)				
<i>sentot</i>	Sentot		1(*)				
<i>djasiman</i>	Djasiman			1			
<i>hebdomadis</i>	Pasteur		1(*)				
<i>wolffii</i>	Horto		1(*)				
<i>tarassovi</i>	Mitis Johnson			1			

A seleção dos espécimes de maior porte para os exames baseou-se nos resultados de trabalho em vários outros países onde os ratos adultos são em geral mais frequentemente infectados (2, 7, 9), uma vez que de acordo com alguns autores, anticorpos maternos recebidos pela via transplacentária ou pelo leite, conferem aos jovens uma proteção duradoura contra a infecção (9).

Conquanto a faixa etária a que pertence o animal seja de reconhecida importância não têm sido observadas diferenças nos percentuais da infecção entre ratos machos e fêmeas (em outras localidades) (7, 9). Entretanto, durante nosso trabalho o percentual de *Rattus norvegicus* fêmeas foi mais elevado que o de machos (Tabela 1).

O percentual de animais sorologicamente positivos (42,0%), obtido no presente

trabalho, é superior ao de outros focos e está acompanhado de elevado percentual de isolamento (52,5%) o que não é observado em outras regiões (7, 9).

Os títulos de soroaglutinação microscópica variaram de 1:100 a 1:3200 (Tabela 2), aglutinando em maior número com *icterohaemorrhagiae* e em maiores títulos com *icterohaemorrhagiae* 3294, cepa nativa do Brasil. A coaglutinação em apenas cinco soros é contrária ao que se observa em soros humanos entre os quais a soroaglutinação cruzada é comum a vários sorotipos.

Os trabalhos realizados anteriormente na cidade do Recife referem a *icterohaemorrhagiae* como o sorotipo mais frequente, em populações humanas (1, 5). O alto percentual de isolamento e a maior incidência de títulos de anticorpos para *icterohaemorrhagiae*, encontrados em *Rattus norvegicus*, confirmam seu papel como reservatório desse sorotipo e sugerem sua importância na transmissão da leptospirose em Recife, embora outros animais possam estar implicados na cadeia epidemiológica da leptospirose, na cidade.

Referências Bibliográficas

1. Azevedo, R. & Corrêa, M.O.A. - Considerações em torno da epidemia de leptospirose na cidade do Recife em 1966: aspectos epidemiológicos laboratoriais e clínicos. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 28:85-111, 1966.
2. Babudieri, B. - Animal reservoirs of leptospires. Ann. N.Y. Acad. Sc., 70:393-413, 1958.
3. Blenden, D.C. - Aspectos epidemiológicos de la leptospirosis. OMS (Publicação Científica), 316:160-168, 1976.
4. Bezjak, V. & Thorburn, H. - Survey of rats (*Rattus norvegicus*) in Kwait for the presence of leptospira. Trp. Geogr. Med., 35:33-36, 1983.
5. Corrêa, M.O.A.; Hyakutake, S. & Azevedo, R. - Considerações sobre novo surto epidêmico da leptospirose na cidade do Recife em 1970. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32:83-87, 1972.
6. Guida, V.O. & Monici, N. - Incidência de leptospires em diversas espécies de animais. I - Frequência no rato (*Rattus norvegicus*). Rev. Paul. Med., 35:121-124, 1949.
7. Hathaway, S.C. & Blackmore, D.K. - Ecological aspects of the epidemiology of infection with leptospires of the Ballum sorogroup in the black rat (*Rattus rattus*) and the brown rat (*Rattus norvegicus*) in New Zealand. J. Hyg. Camb., 87:427-436, 1981.
8. Hyakutake, S., Sant' Anna, I.F.A.B. & Lima, D.P.C. - Investigação sorológica sobre leptospiroses em um grupo populacional do Rio Grande do Norte, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:3-8, 1978.
9. Lindenbaum, I. & Eylan, E. - Leptospirosis in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus* in Israel. J. Med. Scienc., 18:271-275, 1982.
10. Magalhães, M. & Veras, A. - Aspectos sorológicos da leptospirose no Recife. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 12:112-114, 1970.
11. Nóbrega, P. - Sobre a incidência de *Leptospira icterohaemorrhagiae* em ratos da cidade de São Paulo. Bol. Soc. Paul. Vet., 8:81-86, 1947.
12. Sá, L.G.G. & Queiroga, M.F. - Leptospirose: sobre os 23 primeiros casos em crianças de até 14 anos, registrados no isolamento do Hospital Oswaldo Cruz do Recife, período: junho 1967 a outubro 1971. 31º Congresso Médico Acadêmico Estadual de Pernambuco, 1972.
13. Sá, L.G.G. & Queiroga, M.F. - Menigoencefalite por *Leptospira panama*: primeiro caso em uma criança registrado no Hospital Oswaldo Cruz do Recife, outubro de 1968. 31º Congresso Médico Acadêmico de Pernambuco, 1972.
14. Santa Rosa, C.A. - Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. Rev. Microbiol., 1:97-109, 1970.
15. OMS - Classification of leptospires and recent advance in leptospirosis. Wld. Hlth. Org. Bull., 32:881-891, 1965.

YERSÍNIA ENTEROCOLITICA: ISOLAMENTO CONCOMITANTE DE FEZES DE HUMANOS E CÃO

Marly Paiva Nunes
 & Ilvan Delgado Ricciardi

Laboratório de Zoonoses
 Instituto de Microbiologia UFRJ
 Caixa Postal 68040
 21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

O isolamento de oito amostras de *Yersinia enterocolitica* pertencentes ao mesmo bio, soro e fagotipo a partir de adultos, crianças e cão habitantes de casas geminadas de uma vila, na região norte do Rio de Janeiro reforça o conceito de humanos e cães servirem de reservatórios de *Yersinia* sp.

Summary

Yersinia enterocolitica: concomitant isolation from humans and dog

The isolation of eight strains of *Yersinia enterocolitica* belonging to the same bio, sero and phagotype from adults, children and dog living in neighbouring houses in the north region of Rio de Janeiro reinforce the concept that human and dogs could act as reservoirs of *Yersinia* sp.

Introdução

Nos últimos anos *Yersinia enterocolitica* tem sido reconhecida como agente etiológico de variados episódios clínicos no homem, incluindo enterocolite, linfadenite mesentérica, ileite terminal, septicemia, eritema nodoso, artrite e abscessos localizados no fígado e pulmão (3). A maioria dos casos, entretanto, aparece sob a forma de enterocolite, normalmente apresentando diarréia não sanguinolenta e dor abdominal acometendo, frequentemente, crianças (8).

Na Bélgica, foi isolada uma amostra de *Yersinia enterocolitica* de portadores sãos (18). O fato foi também registrado mais tarde, na Itália (7).

Sendo considerada agente causadora de zoonose, *Yersinia enterocolitica* já foi isolada de diversos animais. Os cães têm merecido destaque em trabalhos realizados na Dinamarca (13), Suécia (14), Japão (17), Estados Unidos (20) e Brasil (11). Contudo, não está bastante claro se podem transmitir a infecção ao homem, embora já tenha sido descrito o isolamento simultâneo em animais e crianças habitantes de uma mesma casa (19).

Na tentativa de esclarecer o ciclo epidemiológico das yersinioses foram estudadas 19 amostras de fezes, de uma população restrita a quatro casas (vila) situada na região norte da cidade do Rio de Janeiro, visando isolar *Y. enterocolitica* de humanos e animais.

Material e Métodos

Foram examinadas 19 amostras fecais provenientes de 9 adultos, 5 crianças e 5 cães, todos aparentemente saudáveis, residentes em quatro casas geminadas (vila) na região norte da cidade do Rio de Janeiro.

As fezes foram colhidas com swabs e estocadas em solução tampão fosfato, pH 7.4 (PBS) entre sete a vinte e um dias, à 4°C. O restante do procedimento obedeceu ao descrito por Stumph & col. (16).

Classificação das amostras de *Yersinia enterocolitica* em biotipos, sorotipos e lisotipos - A determinação do biotipo de amostras de *Y. enterocolitica* foi feita através do sistema API-20 e 50 (Analitab Products Inc.). A caracterização completa em bio-soros e lisotipos foi realizada no Instituto Pasteur, Paris, por especial gentileza do Dr. Henri H. Mollaret.

Teste de invasibilidade - "In vitro" - realizado em células HeLa (6); "in vivo" - realizado em olho de cobaia (15), com amostra cultivadas em Tryptic Soy Agar (Difco) a 25°C por 48 horas. O crescimento bacteriano foi suspenso em 1ml de salina a 0,85%, de maneira a se obter cerca de 10^{12} bactérias/ml. Um décimo de mililitro desta suspensão foi inoculado no saco conjuntival de cobaios albinos. Os animais foram observados, diariamente, por sete dias.

Pesquisa de enterotoxina termoestável (ST) - Foi realizado de acordo com o método de Dean & col. (4), modificado por Nunes & Ricciardi (10). As amostras foram semeadas em frascos tipo Erlenmeyer de 500ml de capacidade contendo 25ml de meio (casamino ácido 2%, extrato de levedura 1%, glicose 0,4%, pH 8.5). As culturas foram incubadas sob aeração por 48 horas a 25°C. Em seguida, as culturas foram centrifugadas sob refrigeração, a 10.000rpm por 20 minutos (12). Foram utilizados seis animais para cada teste, realizado duas e quatro horas após a inoculação. O teste foi considerado positivo quando a relação peso dos intestinos/peso das carcaças foi igual a 0,083. O teste foi repetido quando a relação ficava entre 0,080 e 0,082.

Teste de auto-aglutinação (1) - A partir de uma colônia de *Yersinia enterocolitica* cultivada por 48 horas a 25°C em Agar Desoxicolato Citrato (BBL) foram semeados dois tubos contendo meio de Clark & Lubs, sendo um incubado a 25°C e o outro a 37°C, por 20 horas. Para cada amostra foram escolhidas três colônias para o teste. O resultado foi considerado positivo quando a aglutinação foi verificada apenas no tubo incubado a temperatura de 37°C, mostrando um crescimento homogêneo no tubo incubado a 25°C. O teste foi considerado negativo quando, sob ambas as temperaturas, ocorreu crescimento homogêneo.

Teste de cálcio dependência (2) - As amostras de *Yersinia enterocolitica* foram semeadas em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 25°C por 24 horas. Decorrido esse período, os crescimentos foram diluídos em salina tamponada pH 7.4. A partir das diluições 10^{-5} e 10^{-6} , foram semeados 0,1ml em placas de BHI adicionado de 2% de ágar, e incubadas a 25°C e 37°C. O teste foi considerado positivo quando houve crescimento homogêneo na placa incubada a 25°C e o aparecimento de colônias grandes e pequenas na incubada a 37°C. Foi considerado negativo quando sob ambas as temperaturas, ocorreu crescimento homogêneo. A amostra que forneceu teste positivo foi semeada em BHI, adicionado de 2% de ágar e 30mM de CaCl_2 (5), para confirmar a dependência do cálcio associado com a temperatura. A confirmação desta dependência foi mostrada pelo aparecimento de crescimento homogêneo em ambas as temperaturas.

Resultados

A Tabela 1 mostra a relação entre o número de habitantes examinados e o número de isolamentos de *Yersinia enterocolitica* em residentes de quatro casas geminadas (vila). Obteve-se isolamento de *Yersinia enterocolitica* em pelo menos um habitante de cada casa. Das oito amostras isoladas, foi encontrado o mesmo biotipo, sorotipo

e lisotipo (4 - 3 - VIII) nas três amostras de adultos, quatro de crianças e uma de cão, sugerindo um íntimo relacionamento epidemiológico cão-homem (Tabela 2).

Nas provas de patogenicidade as amostras de *Y. enterocolitica* mostraram variabilidade; seis mostraram-se toxigênicas no teste do camundongo recém-nascido, quando a leitura foi realizada com duas horas e apenas três permaneceram positivas quando a leitura foi feita com quatro horas. Na pesquisa do poder invasor apenas quatro amostras foram positivas no teste "in vivo" (Serény), ao passo que todas se mostraram positivas no teste "in vitro", realizado em células HeLa. As oito amostras de *Y. enterocolitica* isoladas de adultos, crianças e cão foram negativas no teste da auto-aglutinação e no teste da cálcio dependência, neste último, com uma única exceção (Tabela 2).

Discussão

Yersinia enterocolitica é considerado um patogênico intestinal. Este estudo realizado em cães e moradores de quatro casas geminadas forneceu 8 amostras de *Yersinia enterocolitica* (Tabela 1). Todas elas resultaram ser do mesmo biotipo 4, sorotipo 3 e lisotipo VIII, independentemente de terem sido isoladas de adultos, crianças e cão. Amostras com tais características têm, com frequência, envolvimento em casos clínicos (3, 9). Nesse estudo, entretanto, foram isoladas de pessoas aparentemente normais, e possivelmente faziam parte da flora normal desses indivíduos, o que confirma o relato de Luppi & Bucci (7), que mencionou esse mesmo sorotipo na Itália, em pessoas sem sintomatologia.

Tabela 2 - Classificação e provas de patogenicidade de amostras de *Yersinia enterocolitica* isoladas dos habitantes residentes em quatro casas geminadas (vila) na região Norte da cidade do Rio de Janeiro.

Símbolos: (1) = Tempo de leitura do teste; + = Teste positivo; - = Teste negativo; NR = Não realizado

Tabela 1 - Relação entre o número de habitantes examinados e o número de isolamentos de *Yersinia enterocolitica* em residentes de quatro casas geminadas (vila) na região Norte da cidade do Rio de Janeiro

Casas	Habitantes/Isolamentos		
	Adultos	Crianças	Cães
1	1/1	1/1	2/0
2	5/1	3/2	2/0
3	2/1	1/1	1/1
4	1/1	0/0	0/0

Amostras	Classificação	Produção de toxina ST		Invasibilidade		Teste da auto-aglutinação	Teste da cálcio dependência
		2h ⁽¹⁾	4h ⁽¹⁾	"in vivo"	"in vitro"		
Fabiano	4-3-VIII	+	-	+	+	-	-
Francisca	4-3-VIII	+	-	NR	+	-	-
Armando	4-3-VIII	+	+	+	+	-	-
Cláudio	4-3-VIII	-	-	+	+	-	-
Suely	4-3-VIII	-	-	NR	+	+	-
Rodrigo	4-3-VIII	+	+	-	+	-	-
Tula	4-3-VIII	+	+	-	+	-	-
Nélio	4-3-VIII	+	-	+	+	-	+

Talvez esta ausência de sintomatologia possa ser explicada pela inconstância de positividade constatada no painel de provas de patogenicidade a que foram submetidas as amostras, particularmente os testes de auto-aglutinação e cálcio

dependência (Tabela 2). Trabalhos recentes mostram que a negatividade destas provas estão associadas a perda de plasmídios (1, 2). É possível que isto tenha ocorrido nas amostras testadas, fato que merece investigação.

Os interessantes resultados obtidos nessa localidade sugerem, primeiramente, um íntimo relacionamento homem-cão e, por outro lado, reforçam a necessidade de estudos visando esclarecer a razão ou razões que condicionam portadores de amostras de *Y. enterocolitica*, teoricamente virulentas, a conviver com estas sem, contudo, mostrarem sinais de doença.

Referências Bibliográficas

- Aulizio, C.C.G.; Stanfield, J.T.; Weagant, S.D. & Hill, W.E. - *Yersiniosis associated with tofu consumption: serological, biochemical and pathogenicity studies of Yersinia enterocolitica isolates*. J. Food Protection, 46:226-230, 1983.
- Berche, P.A. & Carter, P.B. - Calcium requirement and virulence of *Yersinia enterocolitica*. J. Med. Microbiol., 15:277-284, 1982.
- Bottone, E.J. - *Yersinia enterocolitica: a panoramic view of a charismatic microorganism*. CRC Crit. Rev. Microbiol., 5:211-241, 1977.
- Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1972.
- Diaz, R.; Salazar, C. & Toyos, J. - *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3 study of the correlation between calcium dependency, auto-agglutination and lethal effect. Rev. Diag. Biol., 31:203-208, 1982.
- Lee, W.H.; McGrath, P.P.; Carter, P.H. & Eide, E.L. - The ability of some *Yersinia enterocolitica* strains to invade HeLa cells. Can. J. Microbiol., 23:1714-1722, 1977.
- Luppi, A. & Bucci, G. - Portatori asintomatici di *Yersinia enterocolitica* in provincia di Ferrara. Boll. Ist. Sieroter. Milanese, 59:668-671, 1980.
- Mollaret, H.H. - International Committee on Systematic Bacteriology, Sub-Committee on the Taxonomy of *Pasteurella*, *Yersinia* and *Francisella*. Int. J. Syst. Bacteriol., 22:401, 1972.
- Mollaret, H.H.; Bercovier, H. & Alonso Jr., J.M. - Summary of the data received at the WHO Reference Center for *Yersinia enterocolitica*. Contr. Microbiol. Immunol. (Karger-Basel), 5:174-184, 1979.
- Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Detection of *Yersinia enterocolitica* heat-stable enterotoxin by suckling mouse bioassay. J. Clin. Microbiol., 13:783-786, 1981.
- Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em fezes de cães na cidade do Rio de Janeiro. Resumos do XI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Florianópolis, SC, 1981.
- Pai, C.H. & Mors, V. - Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. Infec. Immunity, 19:908-911, 1978.
- Pedersen, K.B. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* from Danish swine and dogs. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 84B:317-318, 1976.
- Pedersen, K.B. & Winblad, S. - Studies on *Yersinia enterocolitica* isolated from swine and dogs. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B., 87:137-140, 1979.
- Serény, B. - Experimental *Shigella* keratoconjunctivitis: a preliminary report. Acta Microbiol. Hung., 2:293-296, 1955.
- Stumph, M.; Ricciardi, I.D.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Bernhoeft, M. - *Yersinia enterocolitica* as a cause of infantile diarrhoea in Rio de Janeiro. Rev. Bras. de Pesquisas Med. e Biol., 11:383-384, 1978.
- Tsubokura, M.; Fukuda, T.; Otsuki, K.; Kubota, M. & Itagari, K. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* from some animals meats. Jap. J. Vet. Sci., 31:213-215, 1975.
- Van Noyen, R.; Vandepitte, J. & Selderslaghs, R. - Human gastrointestinal infections by *Yersinia enterocolitica*. Contr. Microbiol. Immunol. (Karger-Basel), 5:283-291, 1979.

19. Wilson, H.D.; McCormick, J.B. & Feeley, J.C. - *Yersinia enterocolitica* infection in a 4-month-old infant associated with infection in household dogs. *J. Pediatrics*, 89:767-769, 1976.
20. Wooley, R.E.; Shotts Jr., E.B. & McConnell, J.W. - Isolation of *Yersinia enterocolitica* from selected animal species. *Amer. J. Vet. Res.*, 41:1667-1668, 1980.

METRITE PURULENTA EM ÉGUA PURO-SANGUE INGLÊS POR CANDIDA RUGOSA

Waldyr Giorgi
Margareth Elide Genovez

Instituto Biológico
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252
Caixa Postal 7119
01000 São Paulo SP, Brasil

Edward Porto
& Elisabeth Maria Heins

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
Av. Dr. Arnaldo, 455
01246 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Uma égua puro-sangue inglês, que havia dado cria em parto normal, foi coberta novamente no primeiro cio, sendo diagnosticada a prenhez mediante palpação retal. Decorridos alguns meses e não havendo evolução da gestação, foi realizada nova palpação retal, que proporcionou a saída de grande quantidade de pus pela vagina. Foi isolada a levedura *Candida rugosa*, sendo a primeira citação desta espécie causando metrite purulenta em éguas, no Brasil.

Summary

Pyometra in a thoroughbred mare caused by Candida rugosa

After giving birth to a healthy colt and after the first estrus, a mare showed signals of a new pregnancy diagnosed by retal palpation. A few months later gestation signals were not noticed. A new retal palpation yield the discharge of purulent fluid thorough the vagina. *Candida rugosa* was isolated and is reported by the first time as responsible for the pyometra, in Brazil.

Introdução

A infertilidade de éguas, por infecções genitais, resulta em perdas econômicas, principalmente em se tratando de fêmeas de raças apuradas e destinadas a esporte ou trabalho.

A partir de "swabs" vaginais e/ou uterinos de éguas com problemas reprodutivos foram isolados *Streptococcus zooepidemicus*, seguido de coliformes e de *Pseudomonas aeruginosa*, entre as leveduras, *Candida albicans* aparece com maior frequência, corroborando com resultados já divulgados (7, 8).

No presente trabalho é relatado o isolamento de *Candida rugosa*, ainda inédito no Brasil, como causadora de infecções em animais. Esta levedura foi isolada por Anderson, em 1917, de fezes humanas, que descreveu como *Mycoderma rugosa*, tendo sido transferida para o gênero *Candida* em 1942, por Diddens e Lodder (9). Foi também encontrada em fezes de bovino, manteiga deteriorada e água do mar (9).

Em equinos apenas dois registros referem-se à infertilidade de éguas causada por *Candida rugosa*; em 1975 (10) e 1977 (1).

Esta é a primeira referência da espécie no Brasil, causando metrite purulenta em égua P.S.I.

Material e Métodos

Dois "swabs" enbebidos em material purulento, coletados da vagina e útero de uma égua puro-sangue inglês, foram semeados, com agitação vigorosa, em tubos contendo caldo-soro glicosado. A seguir, os mesmos "swabs" foram semeados em placas contendo ágar-sangue e ágar-Teague (eosina-azul de metileno), ficando ambas em estufa a 37°C por 24-48 horas. Quando o caldo-soro glicosado mostrou crescimento de microrganismos, foi passado também nos meios de cultura sólidos acima mencionados. Após incubação, procedeu-se a leitura das placas e, das colônias obtidas, foram feitos esfregaços em lâminas e corados pelo método de Gram, a fim de se verificar a morfologia. Posteriormente, foram utilizados ágar Sabouraud e ágar-fubá Tween 80 e exames bioquímicos para a identificação do agente isolado.

Resultados

Após 24 horas de incubação, todos os meios mostraram cultura pura do microrganismo. Nas placas com ágar-sangue, as colônias eram pequenas, esbranquiçadas e ligeiramente rugosas e no ágar-Teague, o microrganismo estava inibido. A coloração pelo Gram revelou tratar-se morfológicamente de uma levedura, devido a visualização de uma formação grande, arredondada e gram positiva, típica para esse tipo de microrganismo. A amostra isolada foi semeada em ágar Sabouraud onde, após alguns dias em temperatura ambiente, verificou-se a presença de colônias com aspecto sulcado, úmidas, com tonalidade creme e sem brilho. Houve, também, crescimento da levedura, nos tubos mantidos a 37°C. No cultivo em lâmina, contendo ágar-fubá Tween 80, o exame microscópico revelou pseudomicélio ramificado e abundante, consistindo exclusivamente de pseudohifas, com raros blastoconídios, conforme mencionam Meyer & col. (6).

A amostra isolada assimilou apenas alguns álcoolis e carboidratos. Para o auxanograma, utilizaram-se os carboidratos e álcoolis relacionados na chave de identificação proposta por Mc Ginnis (4) e Mc Ginnis & col. (5). Aqui, a habilidade fermentativa foi positiva para dextrose e galactose, não ocorrendo a assimilação da celobiose, galactitol (dulcitol), inositol, lactose, maltose, melobiose, rafinose, sorbose, sacarose, trealose e xilose. Foi negativa a assimilação do nitrato de potássio e a prova de urease.

Tal comportamento permitiu identificar a levedura isolada como *Candida rugosa* (Anderson) Diddens e Lodder, 1942 (9).

Discussão e Conclusão

A égua puro-sangue inglês, da qual foi isolada *Candida rugosa*, havia dado cria em janeiro de 1983, após gestação e parto normais. Quando do aparecimento do chamado "cio do potro" a égua foi novamente coberta. Em fevereiro, foi considerada prenhe após palpação retal, sendo a gestação confirmada num segundo toque, já no mês de março. Entretanto, com o correr dos meses, não foi verificado o aumento do volume do abdome, ou qualquer sinal de gestação. Nova palpação retal revelou aumento de um dos cornos uterinos que, com a manipulação, deu saída, pela vagina, de grande quantidade de material purulento. O pus foi coletado por meio de "swabs" e remetido para cultura dando o isolamento de *Candida rugosa*.

O tratamento clínico foi realizado a base de várias lavagens uterinas com antisséptico e posteriormente com nistatina, além de proteinoterapia injetável e administração de droga imunoestimulante. No final do tratamento foram coletados vários "swabs" da cervix uterina e do fundo de saco vaginal. Exames bacteriológicos

e micológicos realizados não revelaram a existência de crescimento de qualquer microrganismo.

O presente caso assemelha-se muito ao já descrito (1), diferindo apenas quanto ao isolamento de *Pseudomonas aeruginosa* e do tratamento feito com lavagens uterinas utilizando uma solução de antibiótico, o que, provavelmente, forneceu condições para a levedura se implantar e multiplicar no útero, dando origem à metrite purulenta de onde foi isolada.

Em 1977, em caso semelhante ao descrito, Genovez & col. (2) isolaram, também, de material uterino de uma égua P.S.I., a levedura identificada como *Trichosporon capitatum*.

As leveduras apresentam um caráter oportunista e, para se instalarem e desenvolver uma infecção, as condições propícias estão diretamente relacionadas com fatores predisponentes, como avitaminoses, aumento de glicogênio durante o período de gestação, distúrbios endócrinos ou o uso indiscriminado de antibióticos que podem exercer ação seletiva sobre a microbiota genital (3)..

Em caso de comensalismo entre bactérias e fungos, o uso de antibióticos propicia o desenvolvimento do fungo por sua ação bacteriostática sobre outros microrganismos da microbiota genital (1).

Assim, as leveduras em geral e, entre elas, *Candida rugosa*, podem, como agentes oportunistas que são, exercer ação patogênica. No presente caso, tal fato deve ter ocorrido logo após o parto, quando uma alteração nas condições orgânicas do animal, ocasionou o aparecimento de um ou mais fatores predisponentes acima citados.

Referências Bibliográficas

1. Abou-Gamal, M.; Hogle, R.M. & West, J.K. - Pyometra in a mare caused by *Candida rugosa*. J. Am. Vet. Med. Ass., 170:177-178, 1977.
2. Genovez, M.E.; Porto, E. & Heins, E.M. - Isolamento de *Trichosporon capitatum* de material uterino de équa puro-sangue inglês: registro de um caso. Biológico (São Paulo), 45:295-298, 1979.
3. Lacaz, C.S. - Compêndio de micologia médica. São Paulo, Sarvier/Editora da Universidade de São Paulo, 1967.
4. Mc Ginnis, M.R. - Laboratory handbook of medical mycology. New York, Academic Press, 1980.
5. Mc Ginnis, M.R.; D'Amato, R.F. & Land, G.A. - Pictorial handbook of medically important fungi and aerobic actinomycetes. New York, Praeger Publishers, 1982.
6. Meyer, S.A.; Ahearn, D.G. & Yarrow, D. - *Candida rugosa* (Anderson) Diddens et Lodder (1942). In: - The yeasts: a taxonomic study. New York, J.W. Kreger van Rij/Elsevier Science Publishing, p.785-787, 1984.
7. Moreno, G.; Bottino, J.A.; Mós, E.N. & Isey, T. - Infecções genitais de éguas puro sangue inglês provocadas por *Candida albicans*. Biológico (São Paulo), 34:115-117, 1968.
8. Santos, M.R.S.; Giorgi, W.; Portugal, M.A.S.C. & Castro, A.F.P. - Infecções bacterianas do trato genital de éguas puro-sangue inglês. Rev. Med. Vet., 7:53-64, 1971.
9. Uden, N. van & Buckley, H. - *Candida rugosa* (Anderson) Diddens et Lodder (1942). In: - The yeasts: a taxonomic study. 2.ed. London, Lodder J./North-Holland Publishing, p.1032-1034, 1970.
10. Zafracas, A.M. - *Candida* infection of the genital tract in thoroughbred mares. J. Reprod. Fert. Suppl., 23:349-351, 1975.

FOOD-BORNE INTOXICATION BY CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Ruben Pablo Schocken-Iturrino
 Fernando Antonio de Ávila

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

Antonio Nader Filho
 Oswaldo Durival Rossi Junior
 & Odair Martins (Bolsista CNPq)

Deptº de Higiene Veterinária e Saúde Pública
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
 Jaboticabal Unesp

Summary

Study of and outbreak of food-borne intoxication by *Clostridium perfringens* that occur in Jaboticabal, SP. Through the epidemiological investigation the incriminated foods were pork meat and tomato gravy, that were prepared and held at room temperature for several hours before served. The median of incubation period corresponded to 14 hours and 30 minutes while the symptoms varies from 8 to 21 hours. In the large majority of the cases diarrhea and abdominal cramps were the predominant symptoms with 94% and 88% respectively. The countings of *C. perfringens* in stools varies from 10^5 to 10^8 and in the food samples 10^4 to 10^7 .

Resumo***Surto de intoxicação alimentar por Clostridium perfringens***

Estudo de um surto de toxo-infecção alimentar por *Clostridium perfringens* em Jaboticabal, SP. Através do inquérito epidemiológico, os alimentos suspeitos foram a carne de porco assada e molho de tomate, os quais foram cozidos 12 horas antes de seu consumo e mantidos à temperatura ambiente. A mediana do tempo de incubação correspondeu a 14 horas e 30 minutos, enquanto que a duração dos sintomas foi de 8 a 21 horas. Diarréia e cólicas foram os sintomas predominantes (94% e 88% respectivamente). As contagens de *C. perfringens* em fezes variaram de 10^5 a 10^8 ; nas amostras de alimentos suspeitos, de 10^4 a 10^7 .

Introduction

Clostridium perfringens is more widely spread than any other pathogenic bacterium. Its principal habitats are soil and the intestinal contents of man and animals (4, 7, 14). This microorganism received considerable attention in Great Britain in 1953 (8) and has been recognized as a very important food poisoning organism in the United States since that time (4, 9).

In the food-borne intoxications by *C. perfringens*, as showed by epidemiologic research in several countries, the symptomatology is characterized by stomach pains, diarrhea, nausea and general indisposition, frequently without vomiting. Incubation periods vary from 6 to 22 hours, usually 10-12h (4). Type A *C. perfringens* is more frequently in such outbreaks (11).

In Brazil, food-borne intoxications have been ascribed to *Salmonella typhimurium* (17), *Salmonella enteritidis* (13), *Clostridium botulinum* (10). Serrano (16), in 1974, detected a food-borne intoxication by *C. perfringens* involving more than 500 persons at the city of Campinas, SP. A possible food-borne intoxication by *C. perfringens* was cited in two restaurants in the same city in 1978 (15).

With the purpose of putting the authorities on guard with respect to such events, we felt the publication of the present work would be of general interest.

At the Second Universitary Games of "UNESP" at the Campus of Jaboticabal, SP, during the period of October 30 to November 2, 1981, a large number of athletes were fed at the University restaurant. Approximately 950 meals were served daily.

In the early morning of Oct. 31, 1981 and all day long, more than 700 persons showed symptoms of gastrointestinal disease, characterized by diarrhea, abdominal pain and colic, accompanied by large volumes of gas and, in some cases, by nausea, headache, shivering and prostration. All these symptoms developed 10 to 22 hours after the ingestion of the dinner of Oct. 30, 1981, considered as the suspected cause. The absence of fever and the number of persons involved suggest that the illness was an intoxication.

The suspected dinner consisted of pork with tomato gravy, rice, beans, "farofa", tomato or potato salad, and as a drink, water or pasteurized milk.

Material and Methods

Ten hours after the appearance of the first patients presenting symptoms, rests of the suspected foods from the restaurant and feces of patients were collected. One thousand questionaries were distributed among the students using the restaurant services for making an epidemiological search, asking: symptoms, time and date of the consumption of the suspected food, time of onset and type of food eaten at that day.

Portions of all the samples were divided for the isolation of the possibles agents as *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. and enteropathogenic *Escherichia coli*, all of them suspected by the symptoms presented (5).

For isolation of *Clostridium perfringens* one portion of each food was transferred to duplicate tubes of Cooked Meat Medium (Difco). One tube was heated in an 80°C water bath for 15 minutes other remained unheated. After anaerobic and aerobic incubation at 37°C overnight, each culture was streaked on to blood and egg-yolk agar (EYA) plates (6).

For quantitative colony counts of *Clostridium perfringens*, 50g of both food and feces samples were homogenized and diluted in 450ml of sterile buffered dilution water in sterile Waring blender cups for 2 minutes (2). Twenty-six feces samples were collected between the first and third day after the appearance of the symptoms.

Appropriated serial dilutions were made and streaked on sulfite-polymyxin-sulfadiazine agar (SPS-BBL) and tryptone sulfite-neomycin agar (TSN, Merck) plates, incubated aerobically and in anaerobic jars with the GasPak system (BBL) for 24h at 37°C and 46°C. The black colonies developed in these media were counted and enumerated (1, 12).

For confirmation of *C. perfringens*, ten percent of the black colonies from SPS and TSN agars were submitted to microscopic observation for determining the morphology, using Gram's stain, and biochemically on lactose motility agar incubated at 35°C for 24h. Lactose fermentation was indicated by gas bubbles and a change in color of the medium from red to yellow. Production of nitrite from nitrate in tubes of Bacto nitrate-broth was tested for by the addition of about 5 drops each of sulfanilic acid and dimethyl-a-naphthylamine reagent solutions. The

development of a pink color denotes the presence of nitrites, thus together with liquefaction of the gelatin tubes after incubation for 44 hours, constituted a positive test (1). Serotyping was performed by mixing one drop of a formalinized suspension of pure culture (obtained from sediments of centrifuged pure culture growth in BHI) with one drop of the appropriate preparation of specific antisera for *Clostridium perfringens* (Cl. *welchii* Control Serum, Wellcome Research Laboratories - It is a pool for *C. perfringens* types A-B-C-D and E) incubated for 4 hours at 43-45°C in a water bath and observed for clumping of the organisms 20 hours later (4).

For the isolation of *Staphylococcus aureus* from the samples, homogenates were prepared serially, by 10-fold dilution with 0.1% peptone water. Three tubes of trypticase soy broth (Difco) containing 10% NaCl received 1ml aliquots of the decimal dilutions of the samples and were incubated at 37°C for 48 hours. Material from the tubes showing growth was subcultured on to plates of Baird-Parker Agar, (Merck) and Chapman Stone Agar (BBL), and incubated at 37°C for 48 hours to obtain isolated colonies.

Five colonies from each plate resembling *S. aureus* were submitted to microscopic examination by Gram's stained preparations; Gram-positive coccoid forms in "grape-like" clusters were tested for catalase, coagulase, DNAse and thermonuclease production (3).

For the isolation of enteropathogenic *Escherichia coli* 25g portions of samples were homogenized for 30 seconds with 225ml of nutrient broth in beakers (1:10 dilution) and incubated at 35-37°C for 6 hours. After this period, they were streaked on to EMB Agar (Difco) and MacConkey Agar (Difco) plates and incubated at 35-37°C for 24 hours (3).

Characteristic colonies were submitted to Gram's stain examination. Gram-negative, short rods were tested biochemically for H2S production in Triple Sugar-Iron agar (TSI-Merck), and for Voges-Proskauer, indol, KCN and urease reactions.

For the isolation of *Salmonella*, 25g samples were blended with 225ml of tetrathionate broth base with added brilliant green dye (Difco) and incubated at 35-37°C for 24 hours. Afterwards, these were streaked on to SS Agar (Difco) and MacConkey Agar (Difco) and incubated at 35-37°C for 24 hours. After Gram's stain examination suspicious colonies were inoculated on Triple Sugar-Iron Agar (TSI-Merck) and Lysine-Iron Agar (LIA - Merck) slants (3).

Results and Discussion

The most common symptoms registered were: diarrhea and abdominal cramps (Table 1), nobody indicated the presence of fever.

While the incubation period varies between 8 and 21 hours, the largest incidence was from 10 to 12 hours. There were no cases of incubation period with less than 7 hours nor longer than 21 hours. The incubation period average was 11 hours and 23 minutes and the median was 14 hours and 30 minutes. The symptoms of those taken ill lasted no longer than 48 hours (Figure 1).

No *Salmonella* was isolated and the numbers of *E. coli* and *S. aureus* in the food samples were very small. There was no growth of colonies on plates of SPS, TNA and EYA when incubated aerobically, eliminating the possibility of the presence of *Bacillus cereus*. On the other hand, a large number of *C. perfringens* colonies were present in the anaerobic incubation.

Table 1 - Frequency of symptoms from sick persons with food-borne intoxication.

Symbols: * = Number of cases = 430

Symptoms	Nr of cases with symptom*	Percent
Diarrhea	405	94.1
Abdominal cramps	382	88.8
Nausea	18	4.1
Prostipation	14	3.2
Shivering	11	2.5
Headache	07	1.6
Vomiting	03	0.7

Typical colonies of *C. perfringens* were formed on SPS and egg yolk agars; black, with diameter less than 2mm and with an opaque surrounding zone of lecithinase.

Table 2 - Food specific attack rates

Foods	Number of persons who eat specific foods			Number of persons who did not eat specific foods			Difference in percent		
	Ill	Not ill	Total	Ill	Not ill	Total			
		%				%			
Pork	511	19	530	96.4	3	23	26	11.5	+84.9
Tomato gravy	470	25	495	94.9	9	52	61	14.7	+80.2
Rice	448	38	486	92.1	13	57	70	18.5	+73.6
Beans	466	80	546	85.3	10	0	10	100.0	-14.7
"Farofa"	444	84	528	84.0	26	2	28	92.8	- 8.8
Tomato salad	314	112	426	73.7	24	106	130	18.4	+55.3
Potato salad	197	303	500	39.4	48	8	56	85.7	-46.3

The cells appeared as Gram positive rods arranged singly or in pairs, with a few ovoid subterminal spores. Biochemical tests confirmed indole production, nitrate reduction, lack of motility, gelatin liquefaction and fermentation of lactose with gas formation.

Tests with control sera showed that the organism isolated was *C. perfringens*.

Countings of *C. perfringens* on feces from patients and foods samples are shown in Table 3.

Conclusions

The large incidence of *C. perfringens* on feces from patients and in the food samples involved on this outbreak, as well as the absence of other pathogenic organisms in large quantities, suggest that this organism was the responsible by this food-borne intoxication. Identification of the food causing the outbreak is not clear-cut from Table 2 because the combinations of foods eaten and not eaten were complex and not fully known, though the indications are that the cause was the pork. This is confirmed by the tests on foods shown in Table 3.

Figure 1 - Distribution of incubation period for the 430 persons with food-borne intoxication

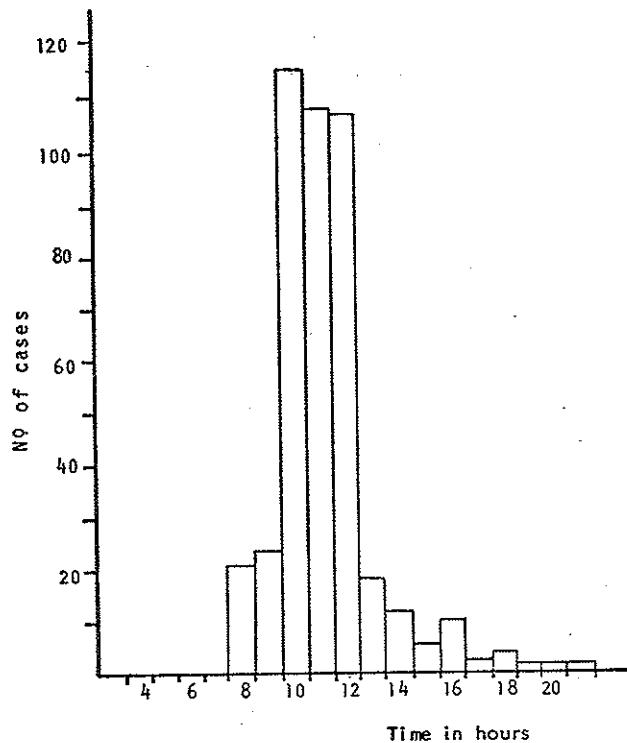


Table 3 - Countings of *Clostridium perfringens* per gram on stool specimens from 26 patients involved in the food-borne intoxication outbreak and on 12 food samples

Nr of microorganisms/g in stool specimens or food samples	% of patients	% of samples
<10 ⁴	0.0	16.7
10 ⁴ - 10 ⁵	7.7	33.3
10 ⁵ - 10 ⁶	15.4	41.7
10 ⁶ - 10 ⁷	34.6	8.3
10 ⁷ - 10 ⁸	26.9	-
>10 ⁸	15.4	-

Acknowledgments

We wish to thank Prof. Frederick C. Strong III for the revision of the manuscript and Edna M. Testa Dáquila for the typing work.

References

- Angelotti, E.; Hall, H.E.; Foster, M.J. & Lewis, K.H. - Quantitation of *Clostridium perfringens* in food. *Appl. Microbiol.*, 10:193-199, 1962.
- APHA - Standard methods for the examination of dairy products. 10.ed. New York, American Public Health Association, 1960.
- APHA - Compendium of methods for the microbiological examinations of foods. New York, American Public Health Association, Marvin L. Speck, 1976.
- Bryan, F.L. - What the sanitarian should know about *Clostridium perfringens* food borne illness. *J. Milk Food. Technol.*, 32:381-389, 1969.
- Bryan, F.L. - Procedures to investigate foodborne illness. Atlanta, Georgia, Center for disease control, 1980.
- Dowell, V.R. & Hawkins, T.M.- Laboratory methods in anaerobic bacteriology. New York, U.S. Dept. Health, Education, and Welfare, Public Health Serv., Publ. 1803, 1968.
- Hall, H.E. & Hauser, G.H. - Examination of feces from food handlers for *Salmonellae*, *Shigellae*, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 14:928-932, 1966.
- Hobbs, B.C.; Smith, M.E.; Oakley, C.L. & Warrack, G.H. - *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.*, 51:75-101, 1953.
- Hobbs, B.C. - *Clostridium perfringens* and *Bacillus cereus* infections. In: - Rieman, H., ed. - Food borne infections and intoxications. New York, Academic Press, 1969.
- Jeffman, I. - Aspectos bacteriológicos relacionados com o anaeróbio responsável pelo surto de botulismo em Porto Alegre, 1958. *Revista da Escola de Agronomia e Veterinária*, 3:37-44, 1960.
- Leitão, M.F.F. - Microrganismos patogênicos na carne e derivados. *Boletim do ITAL*, 59:48, 1978.
- Marshall, R.S.; Steinberg, J.F. & McVl lung, L.S. - Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 13:559-563, 1965.
- Mota da C.C.S.; Vieira, H.R.A., Puzyna, I.P.; Kalache, J.; Knolsaisen, J.F. & Camargo de, N.J. - Toxi-infecção alimentar por *Salmonella enteritidis*: relato de um surto ocorrido em Curitiba, PR., Brasil/julho/81. *Higiene Alimentar*, 2:123-131, 1983.

14. Smith, L.D.S., & Holdeman, L.V. - The pathogenic anaerobic bacteria. Fort Lauderdale, C.C. Thomas, 1968.
15. Salzberg, S.P.; Massaguer, P.R. & Serrano, A.M. - Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. Rev. Microbiol. (São Paulo), 13:26-30, 1982.
16. Serrano, A.M. - Uma infecção alimentar por *Clostridium perfringens*. Atualidades Veterinárias, 29:36, 1976.
17. Silva, G.R.; Silva, I. & Guimarães, C.C. - An outbreak of food poisoning due to *Salmonella typhimurium* in a general hospital. Rev. Inst. Med. Trop. (São Paulo), 6:258-267, 1964.

EFEITO DO ÍON FERRO E DA CONALBUMINA NO DESENVOLVIMENTO E PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES NA LINHAGEM STAPHYLOCOCCUS AUREUS S-6

Elisa Yoko Hirooka

Deptº de Patologia Geral
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina
Caixa Postal 6001
86100 Londrina PR, Brasil

& Sonia Presa Caggiani de Salzberg

Deptº de Ciência de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos Unicamp
Caixa Postal 6121
13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

O efeito da concentração do íon ferro assim como da proteína conalbumina foi estudado na linhagem *Staphylococcus aureus* S-6 desenvolvida num meio contendo hidrolizado de caseína, meio NAK, e no mesmo meio após a remoção dos íons, meio NAKSA. Outras propriedades estudadas foram a produção de proteínas extracelulares coagulase, nuclease e as enterotoxinas A (SEA) e B (SEB). A adição de ferro em concentrações superiores a 1,19 μ g/ml ao meio NAKSA contendo 1,11 μ g/ml de Mg²⁺ teve como consequência efeitos adversos, tanto para o desenvolvimento do microrganismo, quanto na produção de DNase e SEB. A adição de conalbumina ao meio NAKSA com 1,11 μ g/ml de Mg²⁺ não teve efeito inibitório nas propriedades estudadas, ocorrendo inclusive um ligeiro estímulo na produção de proteínas extracelulares. A adição de ferro não afetou a retenção de DNase ligada à superfície celular, indicando que a ação inibitória foi a nível de produção e não de liberação da enzima.

Summary

*Effect of iron and conalbumin on the development and extracellular proteins production by strain *Staphylococcus aureus* S-6*

The effect of iron and the protein conalbumin was studied on strain *Staphylococcus aureus* S-6 grown in a casein hydrolysate medium, NAK, and in the same medium after the ions removal, called NAKSA medium. Other properties under study were the production of extracellular proteins, coagulase, nuclease and enterotoxins A (SEA) and B (SEB). The addition of iron at concentration higher than 1.19 μ g/ml to the NAKSA medium plus 1.11 μ g/ml of Mg²⁺ has adverse effects on the microorganism growth as well as on the DNase and SEB production. The addition of conalbumin to the NAKSA medium plus 1.11 μ g/ml of Mg²⁺ was not inhibitory on the

studied properties being slightly stimulatory on the production of the extracellular proteins. The addition of iron did not affect the DNase associated to the cellular surface showing that the inhibitory effect was on the enzyme production and not on the enzyme liberation.

Introdução

O ferro é considerado um dos metais mais importantes nos sistemas vivos (2, 15). Sua deficiência induz na maior parte dos microrganismos a produção de agentes quelantes denominados genericamente de siderocromos ou deferrisiderocromos (4). Estudos sobre a utilização cruzada de agentes quelantes entre diferentes espécies e gêneros bacterianos permitiram observar um intercâmbio funcional entre os quelantes produzidos por estafilococos e vários gêneros de enterobactérias (11). Outras pesquisas ressaltam a importância dos siderocromos na resistência à infecções bacterianas através da competição com os quelantes naturalmente presentes nos organismos superiores, tais como transferrina e conalbumina (2,4).

Por outro lado foi observado um efeito inibitório do ion ferro na atividade celular de algumas bactérias (3, 20). A produção de várias toxinas microbianas foi afetada pelo ferro, embora esse efeito não fosse observado com a toxina botulínica (22).

Em relação a *S. aureus*, Morita & col. (14) observaram a importância do ferro na produção de enterotoxinas estafilocócicas "in vitro". Meios de composição definida visando optimizar a produção de enterotoxinas têm sido desenvolvidos (9, 13), porém em nenhum deles conseguiu-se atingir um nível de produção comparável ao obtido, utilizando-se meios complexos (19).

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de estudar o efeito do ion ferro no desenvolvimento, morfologia e produção do exoproteínas da linhagem *S. aureus* S-6. A conalbumina foi utilizada para verificar a eficiência dos agentes quelantes desta linhagem na competição com esta proteína na captação do ion ferro. O efeito combinado da conalbumina e do ion ferro foi estudado em relação ao desenvolvimento da linhagem cultivada em uma concentração de magnésio considerada ótima ($1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+}).

O efeito combinado dos íons ferro e magnésio e da conalbumina foi observado em relação à morfologia celular e produção de termonuclease, coagulase e enterotoxinas A e B.

Material e Métodos

Microrganismo - A linhagem utilizada foi *S. aureus* S-6 que apresenta entre outras propriedades, a produção de coagulase, nuclease e as enterotoxinas A e B.

Meios de cultura - a) **Meio NAK** - O meio básico utilizado foi um hidrolizado de caseína (N-Z amine NAK da Sheffield Chemical Co.; Lyndhurst, NJ) na concentração final de 4%, adicionado de 10mg/l de niacina e 0,5mg/l de tiamina; b) **Meio NAKSA** - O hidrolizado de caseína foi tratado com alumina para a remoção de íons e após a adição de niacina e tiamina, denominado de NAKSA. Este meio contém uma concentração residual de ferro de 0,4g/l de uma concentração residual de magnésio de 0,1mg/ml; c) **Meio NAKSA com ferro** - O meio NAKSA foi adicionado de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, obtendo-se diferentes meios contendo concentrações finais do ion compreendidas entre 1,19 a $18,78\mu\text{g}/\text{ml}$. As mesmas quantidades de ferro também foram adicionadas ao meio NAKSA contendo $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} . Esta concentração de magnésio foi selecionada por ser a mínima que permitiu a recuperação do crescimento para os valores obtidos com o meio NAK (Tabela 1); d) **Meio NAKSA com conalbumina** - Os meios NAKSA e NAKSA contendo $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} foram adicionados de 0,3mg/ml de conalbumina; quantidade de conalbumina que quela todos os íons ferro presentes nestes meios (comunicação pessoal).

Tabela 1 - Efeito de ferro e magnésio no crescimento de *S. aureus* S-6.

Símbolos: a. CG(+) = Cocos gram positivos; b. CG(-) = Cocos gram negativos

Meio de cultura	Mg ²⁺ (μg/ml)	Fe ²⁺ (μg/ml)	Relação Fe ²⁺ /Mg ²⁺	Peso seco (mg/ml)	Morfologia (Coloração de Gram)
1. NAK	2,50	2,50	1,0	1,23±0,60	CG(+) ^a
2. NAKSA	0,10	0,40	4,0	0,36±0,27	CG(+)
3. NAKSA	1,11	0,40	0,4	1,16±0,41	CG(+)
4. NAKSA	1,11	1,19	1,1	0,89±0,31	Os mesmos comentários que no meio NAK, com 0,95μ diâmetro
5. NAKSA	1,11	2,13	1,9	0,89±0,36	CG(+)
6. NAKSA	1,11	4,00	3,6	0,77±0,34	CG(+)
7. NAKSA	1,11	18,78	16,9	0,92±0,26	CG(+)
8. NAKSA	0,10	1,19	11,9	0,32±0,07	CG(+)
9. NAKSA	0,10	2,13	21,3	0,20±0,06	Os mesmos comentários que no meio de cultura 8
10. NAKSA	0,10	4,00	40,0	0,28±0,04	Os mesmos comentários que no meio de cultura 8
11. NAKSA	0,10	18,78	187,8	0,40±0,08	CG(+) heterogêneos e com maior número de CG(-)

Concentração iônica - A concentração iônica nos meios NAK e NAKSA foi determinada por espectroscopia de absorção atômica pelo método de Slavin (Pagnocca & Salzberg, em publicação), utilizando-se espetrômetro UNICAMP-SP90.

Inóculo - O inóculo padronizado para todos os experimentos consistiu de 0,1ml de uma diluição 1:5 de uma cultura apresentando um valor de absorbância de 0,3 a 600nm, o que corresponde a 5×10^8 microrganismos. Este inóculo foi adicionado a um volume de meio de 10ml em tubos de 25 x 200nm.

Condições de desenvolvimento das culturas - Todas as culturas foram mantidas a 37°C durante 16 horas a 200rpm em incubador de temperatura e velocidade controlada (New Brunswick Scientific Co., Inc.).

Determinação de peso seco - As culturas foram centrifugadas a 10.800xg por 15 minutos, as células lavadas com água desionizada e secas a 55°C até peso constante.

Morfologia celular - A morfologia celular foi estudada através da observação microscópica dos microrganismos desenvolvidos nos diferentes meios de cultura e tingidos pela coloração de Gram.

Determinação de DNase - A DNase foi determinada pelo método semi-quantitativo em lâmina (7) e pelo método turbidimétrico quantitativo (5).

Determinação de coagulase - A coagulase foi determinada pelo método em tubo (12) e pelo método quantitativo (18).

Determinação de enterotoxinas - A enterotoxina A (EEA) foi quantificada pelo método imunoenzimático (Enzyme Linked Immunosorbent Assay - Elisa) (6) e a enterotoxina B (EEB) pelo método de Oudin (1, 17, 19).

Liberação de enzimas extracelulares superficiais - A liberação de enzimas superficiais e a obtenção de protoplastos foi realizada com lisostafina (Sigma nCL-8255, atividade 270U/ml). Os estafilococos foram lavados duas vezes em tampão Tris 0,05M pH 7,5 e ressuspensos no mesmo tampão contendo 1,2M/l de sacarose (16). A seguir adicionou-se a lisostafina na concentração final de 5,0μg/ml e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Após este período, centrifugou-se a 12.500xg por 15 minutos e tanto o sobrenadante como os protoplastos obtidos foram

utilizados para a determinação de DNase.

Determinação de desidrogenase láctica (LDH) - A desidrogenase láctica foi determinada pelo método de Marbach & Weil (10) tanto no sobrenadante da cultura como na fração celular dos estafilococos lisados com 0,1ml de lisostafina 500 μ g/ml, a 37°C por 1 hora.

Resultados

Desenvolvimento do microrganismo - A adição de ferro ao meio NAKSA + 1,11 μ g/ml de Mg²⁺ em quantidades superiores a 1,19 μ g/ml, teve um efeito adverso ao desenvolvimento do microrganismo, o que pode ser observado pelos valores de peso seco (Tabela 1). A morfologia celular alterou-se progressivamente em concentrações crescentes de ferro, sendo que com 18,78 μ g/ml, o tamanho celular apresentou-se bastante heterogêneo, com células de diâmetro compreendidos entre 0,44 e 1,60 μ g e a proporção de células Gram negativas, já presentes com 0,4 μ g/ml de Fe²⁺, aumentou consideravelmente (Tabela 1).

Produção de enterotoxinas - A quantidade de enterotoxina B no sobrenadante da cultura em meio NAKSA + 1,11 μ g/ml de Mg²⁺ adicionado de ferro foi gradativamente diminuindo, em concentrações crescentes de ferro (Tabela 2). Quanto à enterotoxina A o ferro estimulou ligeiramente ou não afetou a produção desta toxina até a concentração de 4,0 μ g/ml, correspondendo a uma relação ferro/magnésio de 3,6. Porém, para uma relação iônica de 16,9, foi observado um efeito inibitório. Por outra parte, a adição das mesmas quantidades de ferro ao meio NAKSA sem adição de magnésio (concentração residual 0,1 μ g/ml) teve um efeito inibitório na produção de EEA, similar para todas as concentrações de ferro adicionadas, correspondente a um decréscimo de aproximadamente 50% do valor obtido no meio NAK (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito combinado de ferro e magnésio na liberação de proteínas extracelulares por *S. aureus* S-6.

Símbolos: a. EEA = Enterotoxina A; b. EEB = Enterotoxina B; c. TDA = Ágar azul de ortotoluidina - DNA; d. ND = Não determinado

Meio de cultura	Mg ²⁺ (μ g/ml)	Fe ²⁺ (μ g/ml)	Relação Fe ²⁺ /Mg ²⁺	Enterotoxinas EEA ^a (μ g/ml)	EEB ^b (μ g/ml)	TDA ^c (mm)	DNase Turbidimetria (μ g/ml/min.)
NAK	2,50	2,50	1,0	0,643	80,0	4,6	28,45
NAKSA	0,10	0,40	4,0	0,489	4,4	3,0	2,75
NAKSA	1,11	0,40	0,4	0,628	63,0	5,2	89,33
NAKSA	1,11	1,19	1,1	0,643	60,0	4,5	39,78
NAKSA	1,11	2,13	1,9	0,721	56,0	4,0	24,55
NAKSA	1,11	4,00	3,6	0,755	48,0	3,5	21,32
NAKSA	1,11	18,78	16,9	0,562	39,0	3,0	8,75
NAKSA	0,10	1,19	11,9	0,236	ND ^d	2,8	0,52
NAKSA	0,10	2,13	21,3	0,298	ND	2,6	0,41
NAKSA	0,10	4,00	40,0	0,281	ND	2,5	0,46
NAKSA	0,10	18,78	187,8	0,244	ND	2,0	0,46

Produção de termonuclease - A atividade de termonuclease diminuiu com o aumento progressivo da concentração de ferro no meio NAKSA + 1,11 μ g/ml de Mg²⁺ (Tabela 2). Para um teor de ferro 2,13 μ g/ml a atividade obtida, 24,55 μ g/ml/min foi similar a do meio NAK, diminuindo para 8,75 μ g/ml/min no meio com 18,78 μ g/ml de ferro. Por outro lado, a adição das mesmas quantidades de ferro ao meio NAKSA, teve um efeito altamente inibitório na produção de DNase, similar para todas as concentrações de ferro adicionadas (Tabela 2).

Produção de coagulase - A produção de coagulase determinada pelo método quantitativo apresentou um decréscimo no meio NAKSA. Em relação ao meio NAKSA + 1,11 μ g/ml de Mg²⁺ a concentração enzimática manteve-se constante para todas as concentrações de ferro adicionadas com valores comparáveis aos obtidos no meio NAK (Tabela 3).

Tabela 3 - Coagulase no sobrenadante de culturas de *S. aureus* S-6 desenvolvidas em meios contendo diferentes concentrações de ferro

Meio de cultura	Mg ²⁺ (μ g/ml)	Fe ²⁺ (μ g/ml)	Relação Fe ²⁺ /Mg ²⁺	Coagulase (μ g fibrinogênio/ml)
NAK	2,50	2,5	1,0	1610
NAKSA	0,10	0,4	4,0	0365
NAKSA	1,11	0,4	0,4	1440
NAKSA	1,11	1,1	1,0	1700
NAKSA	1,11	2,0	1,8	1440
NAKSA	1,11	4,0	3,6	1230
NAKSA	1,11	8,0	7,2	1540
NAKSA	1,11	16,0	14,4	1360

Efeito da conalbumina no desenvolvimento e secreção de proteínas extracelulares em *S. aureus* S-6 - Embora a adição de conalbumina no meio NAKSA + 1,11 μ g/ml de Mg²⁺ não tenha alterado significativamente a morfologia celular (Tabela 4), houve uma leve diminuição na atividade de DNase no meio NAKSA + 1,11 μ g/ml Mg²⁺ (Tabela 5). Entretanto, esta diminuição de atividade não foi suficientemente acentuada para afirmar que a conalbumina apresenta um efeito inibitório na atividade desta enzima. Em relação a coagulase, verificou-se um leve aumento na produção, quando comparado ao mesmo meio sem adição de conalbumina. A conalbumina não afetou a produção de EEA, nem de EEB, quando adicionada ao meio NAKSA + 1,11 μ g/ml de Mg²⁺. No meio NAKSA sem magnésio embora a conalbumina não afetasse o crescimento da cultura (Tabela 4), ocorreu um aumento na produção de todas as proteínas extracelulares em estudo (Tabela 5).

Tabela 4 - Efeito combinado de conalbumina e magnésio no crescimento de *S. aureus* S-6.

Símbolos: a. CG(+) = Cocos Gram positivos; b. CG(-) = Cocos Gram negativos

Meio de cultura	Mg ²⁺ (μ g/ml)	Conalbumina (ml solução 5mg/ml)	Peso seco (mg/ml)	Morfologia (Coloração de Gram)
NAK	2,50	-	1,23±0,60	CG(+) ^a pequenos, normais
NAKSA	0,10	-	0,36±0,27	CG(+) heterogêneos, grandes, alguns CG(-) ^b
NAKSA	1,11	-	1,16±0,41	CG(+) pequenos e homogêneos, maiores que normais (meio NAK)
NAKSA	0,10	0,6	0,35±0,23	CG(+) heterogêneos e grandes, alguns CG(-)
NAKSA	1,11	0,6	0,91±0,10	CG(+) semelhantes aos desenvolvidos em meio NAKSA + 1,11 μ g/ml de Mg ²⁺

Tabela 5 - Efeito de conalbumina e magnésio na liberação de proteínas extracelulares por *S. aureus* S-6.

Símbolos: a. EEA = Enterotoxina A; b. EEB = Enterotoxina B; c. TDA = Ágar azul de ortotoluidina - DNA

Meio de cultura	Mg ²⁺ (μg/ml)	Conalbumina (ml solução 5mg/ml)	Enterotoxinas EEA ^a (μg/ml)	EEB ^b (μg/ml)	TDA ^c (mm)	DNAse Turbidimetria (μg/ml/min)	Em tubo	Coagulase quantitativo (μg/fibr./ml)
NAK	2,50	-	0,643	80,0	4,6	28,45	4+	1610
NAKSA	0,10	-	0,489	4,4	3,0	2,75	2+	365
NAKSA	1,11	-	0,628	63,0	5,2	89,33	4+	1440
NAKSA	0,10	0,6	0,548	13,1	3,0	3,33	4+	420
NAKSA	1,11	0,6	0,522	61,0	5,0	67,42	4+	1700

Efeito de ferro e conalbumina na concentração de DNase presente na superfície celular - A concentração de nuclease presente na superfície celular foi similar tanto nas células desenvolvidas em meio contendo ferro como em meio sem ferro (Tabela 6). A conalbumina adicionada aos meios de cultura não teve qualquer efeito na concentração desta enzima (Tabela 6).

Efeito do ferro e conalbumina em LDH intracelular - A adição de ferro ou conalbumina não mostrou efeitos inibitórios na produção de LDH, tanto no meio NAKSA, como no meio NAKSA + 1,11 μg/ml de Mg²⁺ (Tabela 7).

Discussão

Apesar do íon ferro ter sido adicionado na forma de Fe²⁺, a oxigenação produzida pela agitação das culturas deve ter oxidado total ou parcialmente este íon, através do tempo. *S. aureus* S-6 foi incubado sob agitação (200rpm), já que a aeração favorece tanto o desenvolvimento celular como a produção de exoproteínas. Por outro lado, a oxidação total ou parcial de Fe²⁺ para Fe³⁺ favorece a captação do íon pelo microrganismo, já que o íon férrico é fortemente quelado pelos siderocromos (4). O íon ferroso atua como agente redutor (8), inibindo o desenvolvimento da cultura o que traz como consequência uma queda do crescimento celular observado através da diminuição no peso seco, alteração na morfologia celular e diminuição na produção de exoproteínas (Tabela 1 e 2). Uma possível explicação para a ação inibitória do íon Fe²⁺ baseia-se no trabalho de Repine & col. (20) em que os autores discutem a reação entre o H₂O₂ formado durante o metabolismo respiratório e o FeSO₄ os quais reagem entre si formando um radical hidroxila tóxico.

As concentrações de ferro compreendidas entre 1,19 e 18,78 μg/ml produziram um decréscimo compreendido entre 2 e 10 vezes na DNase liberada, em relação ao meio NAKSA + 1,11 μg/ml de Mg²⁺, contendo 0,4 μg/ml de ferro residual (Tabela 2). Esta inibição não parece ser devida a uma ação direta do ferro na atividade de DNase já que a adição de ferro em concentrações crescentes ao sobrenadante da cultura em meio NAK não diminuiu a atividade enzimática (dados não apresentados).

Tabela 6 - Tratamento das células de *S. aureus* S-6 com lisostafina: DNase liberada e DNase retirada nos protoplastos.

Símbolos: a = μg/ml de Mg²⁺; b = 0,6 ml da solução de conalbumina a 5,0 mg/ml; c = μg/ml de Fe²⁺

Meio de cultura	DNase (μg/ml/min) Liberada	DNase (μg/ml/min) Retida
NAK	0,394	0,461
NAKSA	0,083	0,089
NAKSA + 1,1Mg ^a	0,467	0,489
NAKSA + conalbuminab	0,094	0,089
NAKSA + 1,1Mg + conalbumina	0,444	0,533
NAKSA + 1,1Mg + 1,1 Fe ^c	0,344	0,433
NAKSA + 1,1Mg + 2,0 Fe	0,250	0,433
NAKSA + 1,1Mg + 4,0 Fe	0,433	0,433
NAKSA + 1,1Mg + 8,0 Fe	0,156	0,399
NAKSA + 1,1Mg + 16,0 Fe	0,394	0,572

É de destacar que no meio NAK, que contém quantidades iguais de ferro e magnésio ($2,5\mu\text{g}/\text{ml}$), obteve-se um bom desenvolvimento celular ($1,23\text{mg}/\text{ml}$) (Tabela 1). Entretanto, a adição de $1,10\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fe^{2+} ao meio NAKSA contendo $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} diminuiu o crescimento para $0,89\text{mg}/\text{ml}$, quando comparado com $1,16\text{mg}/\text{ml}$ obtido no meio NAKSA + $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} e $0,4\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fe^{2+} (Tabela 1). Assim, pode-se inferir que existe uma relação ótima entre as concentrações de Mg^{2+} , Fe^{2+} , como também de outros íons, para o desenvolvimento da cultura e produção de exoenzimas. O tratamento prévio com alumina para a remoção de íons, deve produzir um desequilíbrio iônico que torna crítica a relação entre os íons mais importantes para o desenvolvimento da cultura.

Para verificar se o efeito inibitório era a nível de produção ou de secreção enzimática, estudou-se a ação do ferro em excesso, sobre a DNase ligada à superfície celular através da utilização da lisostafina. Parte da DNase foi liberada ao meio externo após a ruptura da parede celular e parte permaneceu ligada ao protoplasto.

Os resultados apresentados na Tabela 5 mostram que não houve alteração detectável nas atividades de DNase quando comparadas com as mesmas frações celulares obtidas de culturas desenvolvidas em meio NAKSA + $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} sem adição de ferro. Estes resultados aparentemente discordantes com o efeito observado do íon ferro sobre a nuclease extracelular (Tabela 2) poderiam ser explicados pela pequena quantidade de DNase superficial na linhagem *S. aureus* S-6, que é aproximadamente 200 vezes inferior à DNase secretada no meio de cultura. Entretanto, esta pequena quantidade confirma que a ação do íon ferro na DNase secretada é a nível de produção enzimática e não de secreção.

Quanto à coagulase, concentrações de ferro em torno de $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ foram necessárias para a sua produção ótima (Tabela 2). Entretanto, o excesso de íon mostrou-se prejudicial à sua produção, embora não tenha sido tão drasticamente inibida pelo íon como a DNase.

Foi observado um estímulo na produção de EEA pela adição de concentrações de ferro de até $4,0\mu\text{g}/\text{ml}$ ao meio NAKSA + $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} , enquanto que para a EEB ocorreu inibição para todas as concentrações adicionadas (Tabela 2).

A importância de uma concentração mínima de ferro na produção de enterotoxinas foi analisada por Morita & col. (14). Estes autores verificaram uma produção máxima de enterotoxina após a adição de $5,0\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} e $0,5\mu\text{g}/\text{ml}$ de ferro. Em nosso caso, $0,4\mu\text{g}/\text{ml}$ de ferro residual foi suficiente para a produção ótima de EEB numa concentração de magnésio de $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$.

Para cada microrganismo existe uma concentração ótima de ferro, o que se traduz numa produção ótima de enzimas e outros metabólitos (13, 22). Em nosso trabalho observamos que uma quantidade adequada de ferro foi necessária para a produção de EEA e coagulase, enquanto que a adição de qualquer concentração de ferro foi prejudicial à produção de EEB e DNase.

Quanto à produção de desidrogenase lática, não se verificou nenhum efeito inibitório mesmo com a adição de $18,78\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fe^{2+} (Tabela 7) provavelmente devido à sua localização intracelular e a mediação de sistema de transporte a nível de membrana celular, que tende a manter as condições intracelulares estáveis. Por outro lado, a síntese de enzimas extracelulares seria mais afetada por qualquer alteração das condições externas devido a sua localização superficial.

Em relação à conalbumina, embora não se tenha observado nenhum efeito deste quelante nas células desenvolvidas em meio NAKSA adicionado de $1,11\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} ,

Tabela 7 - Desidrogenase lática em células de *S. aureus* S-6 desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA adicionadas de magnésio, ferro e conalbumina.

Símbolos: a = LDH - Desidrogenase lática; b = Nde - Não detectado; c = $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} ; d = $0,6\text{ml}$ da solução do conalbumina a $5,0\text{mg}/\text{ml}$; e = $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fe^{2+}

Meio de cultura	LDHa ($\mu\text{U}/\text{ml}$)
NAK	233,3
NAKSA	Nde ^b
NAKSA + $1,1\text{Mg}^{\text{C}}$	128,9
NAKSA + conalbumina ^d	Nde
NAKSA + $1,1\text{Mg}$ + conalbumina	104,5
NAKSA + $1,1\text{Mg}$ + $1,1\text{ Fe}^{\text{E}}$	104,5
NAKSA + $1,1\text{Mg}$ + $2,0\text{ Fe}$	153,3
NAKSA + $1,1\text{Mg}$ + $4,0\text{ Fe}$	141,1
NAKSA + $1,1\text{Mg}$ + $8,0\text{ Fe}$	117,8
NAKSA + $1,1\text{Mg}$ + $16,0\text{ Fe}$	160,0

observou-se que houve um ligeiro aumento na produção de proteínas extracelulares no mesmo meio sem adição de magnésio (Tabela 5). Uma possível explicação para este resultado seria a introdução, junto com a conalbumina de pequenas quantidades de "contaminantes" iônicos, imprescindíveis ao desenvolvimento do microrganismo. Aliado a este conceito o sistema quelante de ferro em *S. aureus* apresentaria uma constante de quelação maior do que a conalbumina, vencendo na competição. Desta forma, tanto o ferro remanescente, como os outros íons introduzidos como impurezas junto a conalbumina no meio NAKSA, seriam captados preferencialmente pelo microrganismo.

A capacidade de *S. aureus* de se desenvolver na presença de conalbumina é sugerido por Safonova & col. (21) e Valenti & col. (23) para o isolamento e diferenciação destes microrganismos em patogênicos e não patogênicos.

Os sistemas quelantes de íons de *S. aureus* têm sido pouco estudados, porém pesquisas realizadas por Maskell (11) indicam que o mecanismo de assimilação de ferro entre enterobactérias e estafilococos seja semelhante, já que a enteroquelina produzida pelas enterobactérias é utilizada pelos estafilococos. Entretanto, para afirmar que os estafilococos produzem agentes quelantes de estrutura semelhante à enteroquelina são necessárias provas mais conclusivas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Merlin S. Bergdoll do Food Research Institute, Universidade de Wisconsin, Madison, WI, USA, pela cultura *Staphylococcus* S-6 e reagentes para as análises de enterotoxinas. Ao Dr. Aldo Focesi Jr. do Departamento de Biologia da UNICAMP, Campinas, SP, Brasil pelo suplemento de conalbumina. A primeira autora agradece ao CNPq pela bolsa de pesquisa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Bergdoll, M.S. - Enterotoxins. In: - Montie, T.C.; Kadis, S. & Ajl, S.V. - Microbial toxins. New York, Academic Press, v.3, p.265-326, 1970.
2. Bullen, J.J.; Rogers, H.L. & Griffiths, E. - Bacterial iron metabolism in infection and immunity. In: - Neillands, J.B. - Microbial iron metabolism: a comprehensive treatise. New York, Academic Press, p.517-551, 1974.
3. Cowart, R.E. & Foster, B.G. - The role of iron in the production of hemolysin by *Listeria monocytogenes*. Curr. Microbiol., 6:287-290, 1981.
4. Emery, T. - The storage and transport of iron. In: - Sigel, H. - Metal ions in biological systems. New York, Marcell Dekker, v.7, p.77-121, 1978.
5. Erickson, A & Deibel, R.H. - Turbidimetric assay of staphylococcal nuclease. Appl. Microbiol., 25:337-341, 1973.
6. Freed, R.C.; Evenson, M.L.; Reiser, R.F. & Bergdoll, M.S. - Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Microbiol., 44:1349-1355, 1982.
7. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol., 21:585-587, 1971.
8. Lee, K. & Clydesdale, F.M. - Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble, and complex iron in foods. J. Food Sci. 44:549-554, 1979.
9. Mah, R.A.; Fung, D.Y.C. & Morse, S.A. - Nutritional requirements of *Staphylococcus aureus* S-6. Appl. Microbiol., 15:866-870, 1967.
10. Marbach, E.P. & Weil, M.H. - Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Clin. Chem., 13:314-317, 1967.
11. Maskell, J.P. - The functional interchangeability of enterobacterial and staphylococcal iron chelators. Ant. van Leeuw., 46:343-351, 1980.
12. Meyer, W. - "Über die brauchbarkeit des Koagulasetestes mit verschiedenen plasmaarten zur differenzierung von *Staphylococcus aureus* - stämmen. Zbl Bakt. J. Abt. Orig., 209:465-481, 1966.

13. Miller, R.D. & Fung, D.Y.C. - Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.*, 25:800-806, 1973.
14. Morita, T.N.; Patterson, J.E. & Woodburn, M.J. - Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal enterotoxins A, B and C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:39-42, 1979.
15. Neilands, J.B. - Iron and its role in microbial physiology. In: - Neilands, J.B. - *Microbial iron metabolism: a comprehensive treatise*. New York, Academic Press, p.3-33, 1974.
16. Okabayashi, K. & Mizuno, D. - Surface-bound nuclease of *Staphylococcus aureus*: localization of the enzyme. *J. Bacteriol.*, 117:215-221, 1974.
17. Oudin, J. - Specific precipitation in gels. *Methods Med. Res.*, 5:335-378, 1952.
18. Pereira, J.L. & Salzberg, S.P.C. - Dosagem da enzima estafilocoagulase através da coagulação de fibrinogênio. 9º Congresso Latinoamericano de Microbiologia, São Paulo, julho 1983. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1983.
19. Reiser, R.F. & Weiss, K.F. - Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. *Appl. Microbiol.*, 18:1041-1043, 1963.
20. Repine, J.E.; Fox, R.B.; Berger, E.M. & Harada, R.N. - Effect of staphylococcal iron content on the killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. *Infect. Immun.*, 32:407-410, 1981.
21. Safanova, T.B.; Afanasieva, T.I. & Sobolev, V.R. - Inhibitory effect of egg albumin on growth of coagulase-negative species of staphylococci. *Antibiotiki*, 24:440-444, 1979.
22. Siegel, L.S. - Effect of iron on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* type A. *Curr. Microbiol.*, 6:127-130, 1981.
23. Valenti, P. DeStasio, A.; Seganti, L.; Mastromarino, P.; Sinibaldi, L. & Orsi, N. - Capacity of staphylococci to grow in the presence of ovotransferrin or CrCl as a character of potential pathogenicity. *J. Clin. Microbiol.*, 11:445-447, 1980.

IDENTIFICAÇÃO E ENUMERAÇÃO RÁPIDAS DE *SALMONELLA TYPHIMURIUM* NA CLARA E NO OVO LÍQUIDO, PELA TÉCNICA DE MEMBRANA FILTRANTE

Clarice Queico Fujimura Leite

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

Pedro de Magalhães Lacava

Deptº de Bioquímica
Instituto de Biociências UNESP
Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

& Fumio Yokoya

Deptº de Ciências de Alimentos
Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP
Caixa Postal 6121
13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

Desenvolveu-se uma metodologia para identificação e enumeração de *Salmonella* na clara e no ovo líquido, mediante o uso de membrana filtrante, segundo uma técnica simples, reproduzível e pouco onerosa. O emprego da protease bacteriana Alcalase possibilitou a filtração de até 5,0g de clara e 2,5g de ovo líquido, contaminados artificialmente com *S. typhimurium*, através da membrana HAWG 47mm da marca Millipore. A identificação e a contagem dos microrganismos retidos na membrana se deu em menos de 24 horas, pelo uso de meios seletivos e diferenciadores. Detectou-se até 0,3 célula de *Salmonella* por grama de clara, pela técnica de membrana filtrante.

Summary

Quick identification and enumeration of Salmonella typhimurium in egg white and liquid egg through the use of membrane filter technique

A sensible, simplified and low-cost method for quick identification and enumeration of *S. typhimurium* was developed with membrane 5.0g of egg white and 2.5g of whole liquid egg were passed through Millipore membrane HAWG 47mm after digestion with bacterial protease Alcalase. Identification and enumeration of *Salmonella* on the membrane were done after 18hr with the use of selective media. The technique yielded, 0.3 *Salmonella* cell per gram of egg white.

Introdução

Salmonella é um dos grupos de um dos microrganismos mais frequentemente

pesquisados em alimentos, pela importância médica, como responsável por inúmeros surtos de gastroenterite (9, 12). Porém, o isolamento desses germes constitui problema técnico complexo, principalmente quando presentes em número reduzido no material. Para superar as dificuldades, o microbiologista lança mão de pré-enriquecimento (18) e de um enriquecimento seletivo (11), para a recuperação da *Salmonella*, antes de prosseguir no esquema geral de isolamento e identificação de enterobactérias, através de plaqueamento em meios seletivos e diferenciais (1), caracterização bioquímica (10) e análise antigenica (10). Vários trabalhos têm sido realizados, para reduzir o tempo de análise (2), para desenvolver metodologias mais eficazes, porém muito onerosas, como imunofluorescência (15), ensaio-imunoenzimático (16), radiometria (22) e hibridação DNA-DNA (4).

Além da verificação da presença ou ausência de salmonelas, em 25g de alimento, a necessidade de enumerá-las começou a preocupar os microbiologistas, pois a quantidade de microrganismos, necessária para promover a infecção, varia de acordo com a espécie e o sorotipo (13, 14). Tentativas de enumeração envolveram o método de plaqueamento em superfície, empregando ágar seletivo ou o método de Número Mais Provável em meio de enriquecimento (17). O método de plaqueamento é impraticável, quando salmonelas estão presentes em baixa concentração no alimento, além do que a pesquisa pode ficar prejudicada quando a amostra contém outros contaminantes capazes de crescer no meio seletivo (17). A técnica de NMP, apresenta inconvenientes, como a diminuição da seletividade do meio, devido à introdução de alimentos ricos, na cultura (21); fornecimento de resultados falso-negativos, pela presença de inibidores naturais e artificiais nos alimentos (21) e, sendo esse método um teste de número mais provável, ou seja, uma estimativa baseada em fórmulas de probabilidade, sua exatidão está na dependência do número de tubos de cultivo usados nos testes.

A técnica de membrana filtrante (MF) é correntemente utilizada para análise microbiológica de águas (6) ou em alimentos líquidos com pequena quantidade de material em suspensão (5, 20). A maioria dos alimentos, porém, requer algum tratamento para aumentar a filtrabilidade, como acontece com ervilha, carne moída (21) e gelatina (3), que ocluem os poros da membrana bacteriológica, antes da passagem de quantidades significativas de amostras.

Esse trabalho foi direcionado no sentido de estudar tratamentos que aumentassem a filtrabilidade do ovo líquido e da clara de ovo e ao mesmo tempo verificar o grau de recuperação de salmonelas presentes nesses materiais analisados.

Material e Métodos

Preparação de clara e de ovo líquido - As amostras foram preparadas no laboratório, a partir de ovos provenientes de uma granja de Campinas, SP. Os ovos foram lavados cuidadosamente com detergentes e submersos por seis horas, em solução de etanol a 70% e, finalmente, a casca foi flambada na chama. Os ovos foram abertos integral, sem a casca, vertido para recipiente estéril, com pérolas de vidro para obtenção de ovo líquido. Estas amostras foram inoculadas com suspensão de *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 provenientes de uma cultura de 24 horas em caldo BHI-Difco. Antes da inoculação a cultura foi submetida a diluições sucessivas, em solução salina a 0,85%, para fornecer uma concentração final de 0,1 a 20 células viáveis por grama de amostra.

Tratamento das amostras com protease bacteriana Alcalase e recuperação das salmonelas - 5,0g de amostra de clara, previamente inoculada com salmonelas, foi tratada com 0,045 unidade Anson por grama (AU/g) de Alcalase (19) por 45 minutos a 40°C, agitando intermitentemente o frasco em banho-maria. Após a digestão proteica a amostra foi filtrada através da membrana HAWG 04700 Millipore, sob vácuo de 300mm de Hg, lavando-se a membrana com água destilada estéril por três vezes. Para o ovo líquido, 2,5g de amostra, inoculada com salmonelas, foram tratados com 0,09AU/g de Alcalase, por 45 minutos a 40°C; com agitação intermitente. Em seguida, foram adicionados 2,0ml de solução de NaOH 0,05N e 5,0ml de solução a 5% de Tween 80,

para a filtração através da membrana, nas mesmas condições utilizadas para a clara.

As membranas, com células de salmonelas retidas, foram transferidas para placas de Petri, contendo uma almofada embebida em caldo lactosado-Difco de concentração dupla e incubadas por 1,5 hora a 35°C. Após esse tempo de pré-enriquecimento, as membranas foram transferidas para outra almofada, contendo caldo tetratrationato, sem cálcio, e incubadas novamente a 35°C por 3 horas, seguindo-se então, o método proposto por Klaber e Clark (8). Estes autores recomendam, após o enriquecimento seletivo, a transferência das membranas para as placas contendo almofadas embebidas em caldo verde-brilhante, de concentração dupla, incubando-as a 35°C, por 15 horas, com posterior verificação da produção de urease, depositando as membranas sobre o reagente, para a prova de uréia, também embebido em almofadas, observando-se o resultado em menos de 20 minutos. As colônias vermelhas, não produtoras de urease, que cresceram sobre as membranas, foram contadas como salmonelas e nelas realizadas a sorologia em lâmina (10).

Comparativamente, foi feita a recuperação das salmonelas em 25g das mesmas amostras de clara e de ovo líquido, contaminados artificialmente, pela técnica clássica de pré-enriquecimento em caldo lactosado, enriquecimento em caldo tetratrationato, isolamento em ágar SS e ágar verde brilhante, concluindo com a prova sorológica (10).

Resultados e Discussão

O tratamento da clara com Alcalase possibilitou a filtração de 5,0g de amostra, ao passo que o ovo líquido, devido ao alto teor de gordura, foram requeridos tratamentos adicionais com solução diluída de NaOH e Tween 80, para alcançar uma filtrabilidade de 2,5g. Esses tratamentos mostraram ser satisfatórios pois aumentaram de 250 vezes a quantidade filtrável de clara e de ovo líquido, quando comparados com amostras "in natura". Resultados similares foram obtidos por outros autores que conseguiram, através de diversos tratamentos, filtrar 5,0g de amostra de leite em pó desengordurado (20), 0,5g de carne moída, 0,7g de ervilha (21) e 5,0g de gelatina (3).

A recuperação comparativa, entre a técnica de MF e o método clássico de enriquecimento para salmonelas, inoculadas nas amostras de clara e de ovo líquido, foram verificadas através de experimentos realizados.

A adição de soluções de NaOH e de Tween 80, após digestão enzimática, aumentou a quantidade de ovo líquido filtrável, porém acarretou o incremento do pH, que prejudicou a recuperação de *S. typhimurium*. Contou-se, sobre as membranas, na maioria das vezes, número de colônias inferior ao inoculado, porém com exceção de um único experimento, os resultados foram sempre positivos, quando a contaminação excedeu de três células.

Com relação à clara de ovo, Kirkhan e Hartman (7), em 1962, já alertavam sobre a viabilidade do emprego da membrana filtrante, para o isolamento de *Salmonella* de albumina de ovo desidratado. Esta era tratada com protease e celite; porém, foi observada baixa reprodutividade, em 10g de amostra.

A técnica proposta demonstra que, quando as salmonelas estão presentes na clara, em concentrações muito baixas, da ordem de 0,1 a 0,2 microrganismos, por grama de amostra, não é possível sua recuperação, pela técnica de membrana filtrante, sendo possível detectar a presença pelo método de enriquecimento. Isto se deve ao fato de as quantidades de amostras utilizadas serem diferentes, isto é, 5,0g de clara, para a técnica da membrana e 25g, para o de enriquecimento. Apesar da quantidade da amostra ser fator limitante, foi surpreendente a sensibilidade, demonstrada pela técnica da membrana filtrante, em relação à recuperação e contagem de baixa densidade de salmonelas na clara. Uma população microbiana de 0,3 ou 0,4 bactéria por grama de clara foi recuperada, a partir de 5,0g de amostra, fornecendo contagem em menos de 24h, de 2 ou 3 salmonelas na membrana, identificadas pela prova de urease e pelos soros antiflagelar e antissomático polivalentes.

A técnica de MF requer reduzida quantidade de vidraria e meios de cultura; fornece resultados em tempo mínimo; elimina interferentes ou componentes que alteram a seletividade do meio permite clareza na contagem das colônias de

salmonelas isoladas. Em vista desses resultados sugere-se utilização desta técnica nas indústrias que processam ovos, para controlar matérias-primas ou etapas de processamento, bem como na avaliação rápida do grau de contaminação dos ovos industrializados, nas indústrias alimentícias que utilizam ovos para confecção de outros produtos. Porém, extensivos estudos ainda são requeridos para completa avaliação da aplicabilidade desse método.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com o auxílio financeiro concedido pela FAPESP (Processo nº 80/1833-0) e pelo CNPq (Processo nº 101737-82).

Referências Bibliográficas

- Banwart, G.J. & Ayres, J.C. - Effects of various enrichment broths and selective agars upon the growth of several species of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.*, 1:296-301, 1953.
- Banwart, G.J. & Kreitzer, M.J. - Rapid determination of *Salmonella* in samples of egg noodles, cake mixes and candies. *Appl. Microbiol.*, 18:838-842, 1969.
- Chesworth, K.A.C.; Sinclair, A.; Stretton, R.J. & Hayes, W.P. - An enzymic technique for the microbiological examination of pharmaceutical gelatin. *J. Pharm. Pharmac.*, 29:60-61, 1977.
- Fitts, R.; Diamond, M.; Hamilton, C. & Neri, M. - DNA-DNA hibridization assay for detection of *Salmonella* ssp. in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46:1146-1151, 1963.
- Haas, G.J. - Use of the membrane filter in the brewing laboratory. *Wallerstein Lab. Commun.*, 19:7-21, 1956.
- Hsu, S.C. & Williams, T.J. - Evaluation of factors affecting the membrane filter technique for drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44:453-460, 1982.
- Kirkhan, M.K. & Hartman, P.A. - Membrane filter method for the detection and enumeration of *Salmonella* in egg albumen. *Poult. Sci.*, 41:1082-1088, 1962.
- Klamer, P.W. & Clark, H.F. - The use of differential media with the membrane filter. *American Journal Health and the Nation's Health* (New York), 42:390-392, 1952.
- Kotaka, P.I. - Surto de toxo-infecção alimentar, ocorrido em Curitiba, Paraná, em 1978. *Bol. Epidemiol.*, 11:50-53, 1979.
- Leusden, F.M. - The standard *Salmonella* isolation methods. In: - Covry, J.E.L. & col., eds. - *Isolation and identification methods for food poisoning organisms*. London, Academic Press, p.160-165, 1982.
- Litchfield, J.H. - *Salmonella* and food industry: methods for isolation, identification and enumeration. *Crit. Rev. Food Technol.*, 3:415-456, 1973.
- Lundbeck, H. - The swedish *Salmonella* outbreak of 1953. *J. Appl. Bacteriol.*, 18:535, 1955.
- McCullough, N.B. & Eisele, W.C. - Experimental human salmonellosis. I - Pathogenicity of strains of *Salmonella meleagridis* and *Salmonella anatum* obtained from spray-dried whole egg. *J. Infect. Dis.*, 88:278-289, 1951.
- McCullough, N.B. & Eisele, C.W. - Experimental human salmonellosis. IV - Pathogenicity of strains of *Salmonella pullorum* obtained from spray-dried whole egg. *J. Infect. Dis.*, 89:259-265, 1951.
- Mohr, H.K.; Trenk, H.L. & Yeterian, M. - Comparison of fluorescent - antibody methods and enrichment serology for the detection of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.*, 27:324-328, 1974.
- Minnich, S.A.; Hartman, P.A. & Heimsch, R.C. - Enzyme immunoassay for detection of *Salmonella* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:877-883, 1982.
- Morgan-Jones, S.C. - A method for enumerating *Salmonella* from environments in the poultry industry. In: - Covry, J.E. & col., eds. - *Isolation and identification methods for food poisoning organisms*. London, Academic Press, p.78, 1982.

18. North Jr., W.R. - Lactose pre-enrichment method for isolation of *Salmonella* from dried egg albumin. *Appl. Microbiol.*, 9:188-195, 1961.
19. Novo Industri A/S/Dinamarca - Alcalase. Dinamarca, Bags vaerd, 1977.
20. Peterkin, P.I. & Sharpe, A.N. - Membrane filtration of dairy products for microbiological analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39:1138-1143, 1980.
21. Sharpe, A.N.; Peterkin, P.I. & Malik, N. - Improved detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods by a membrane filter method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:431-435, 1979.
22. Stwart, B.J.; Eyles, M.J. & Murrel, W.G. - Rapid radiometric method for detection of *Salmonella* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:223-330, 1980.

ESTUDIO BACTERIOLÓGICO DEL QUESO DE CAMPO VENDIDO EN LA CIUDAD DE VALDIVIA (CHILE)*

Renate Schoebitz

Luis Montes

& Raúl Castro

Instituto de Medicina Preventiva Veterinaria
 Facultad de Ciencias Veterinarias
 Casilla 567
 Valdivia Chile

Resumen

Para conocer la calidad microbiológica del queso de campo vendido en la ciudad de Valdivia (Chile), se analizaron 67 muestras de este producto. A cada una de ellas se les determinó el número más probable de coliformes totales y *Escherichia coli* así como el recuento de *Staphylococcus aureus*. La numeración de coliformes totales se realizó mediante la prueba de tubos múltiples de fermentación en caldo bilis verde brillante al 2% y en la detección de *E. coli* se empleó la prueba de Mackenzie. Para el recuento de *S. aureus* se sembró sobre agar Baird Parker, confirmándose un número determinado de colonias sospechosas mediante las pruebas de la coagulasa y termonucleasa. Los resultados indicaron una media geométrica de $2,25 \times 10^4$ /g para coliformes totales y de $5,68 \times 10^2$ /g para *E. coli* mientras que para *S. aureus* se obtuvo una media geométrica de $5,26 \times 10^3$ /g. Se observó que un 89,5% de las muestras tenían presencia de *E. coli*, en tanto un 77,6% de ellas mostraba presencia de *S. aureus*. Se concluye que un alto porcentaje de los quesos estudiados no son aptos para el consumo, constituyendo un riesgo para la salud pública.

Summary

Bacteriological study of the farm cheese sold in the town of Valdivia (Chile)

In order to find out about the bacteriological quality of the farm cheese sold in the town of Valdivia (Chile), 67 samples of this product were analyzed. For each sample the total coliform and *Escherichia coli* most probable number (M.P.N.), as well as the presence of *Staphylococcus aureus*, was determined. For the coliform M.P.N. brilliant green bile broth was used and the detection of *E. coli* was done with the Mackenzie test. The isolation and total count of *S. aureus* was performed on Baird Parker agar, using the coagulase and thermostable nuclease test for confirmation of the suspect colonies. The results showed a geometric mean of $2,25 \times 10^4$ total coliforms/g and a mean count of $5,68 \times 10^2$ *E. coli*/g, while *S. aureus* had a mean count of $5,26 \times 10^3$ bacteria/g. It was possible to isolate *E. coli* in 89,5% of the

* Trabajo financiado parcialmente con fondos de la Dirección de Investigación y Desarrollo, Universidad Austral de Chile (Proyecto S-83-55).

samples while *S. aureus* was present in a 77,6% of them. It is concluded that a high percentage of the cheese samples studied are not appropriate for human consumption and that therefore this product constitutes a public health hazard.

Introducción

Siendo Chile un país en vías de desarrollo, existe la necesidad de fomentar el avance de diversos sectores de la producción. Entre ellos tiene gran importancia la agricultura, dentro de la cual la agroindustria ha cobrado importancia en estos últimos años, especialmente en lo que se refiere a la elaboración de subproductos lácteos. Se presenta aquí sin embargo el inconveniente, que por falta de conocimiento y recursos económicos, se elaboran productos que no cumplen con las exigencias sanitarias establecidas. Es éste el caso del queso de campo, elaborado con leche cruda o levemente calentada, que se comercializa con frecuencia en los mercados de nuestras ciudades.

Existe en Chile aún escasa información sobre la calidad microbiológica de los quesos elaborados en forma artesanal, teniendo por otro lado el consumidor poco conocimiento sobre el riesgo a que se expone al adquirir estos productos. Sin embargo, estudios realizados en otros países sudamericanos tanto en leche destinada a la fabricación de quesos como en los quesos mismos, revelan que éstos constituyen un riesgo para la salud pública debido al elevado número de microorganismos de origen fecal así como *Staphylococcus aureus* encontrados, aislando además bacterias patógenas como *Salmonella* y *Bacillus cereus* entre otras (1, 8).

Para contribuir al mejor conocimiento sobre las condiciones sanitarias de elaboración del queso de campo, se han planteado como objetivos del presente estudio determinar la calidad microbiológica de éste producto, cuantificando los microorganismos indicadores de contaminación fecal y determinando la presencia de *S. aureus* como bacteria potencialmente patógena.

Material y Método

Entre enero de 1983 y febrero de 1984 se recolectaron un total de 67 muestras de queso de fabricación artesanal vendidos en diferentes mercados de la ciudad de Valdivia. Debido a la baja producción de este tipo de quesos, entre los meses de junio y septiembre, no fue posible obtener muestras en ese lapso.

Los quesos se trasladaron de inmediato al laboratorio donde fueron rotulados y procesados el mismo día de su adquisición. Para cada uno de ellos se realizó el recuento de coliformes totales y *Escherichia coli* por medio de la técnica del número más probable (N.M.P.), sembrando para coliformes totales en caldo lauril sulfato triptosa (Difco) y caldo bilis verde brillante al 2% (Merck). La enumeración de *E. coli* se realizó mediante la prueba de Mackenzie (13) y el recuento de *Staphylococcus aureus* por medio de la siembra sobre placas de agar Baird Parker (Merck), confirmándose un número de colonias sospechosas a través de las pruebas de la coagulasa y tertonucleasa.

Las técnicas microbiológicas y los medios de cultivo utilizados en este trabajo son los descritos por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (I.C.M.S.F.) (12).

Resultados y Discusión

El queso de campo, elaborado con leche cruda en forma artesanal, es un producto de consumo frecuente. Este, de acuerdo a nuestros resultados, presenta en nuestro medio un alto grado de contaminación, lo cual se comprueba por el elevado número de muestras con presencia de microorganismos coliformes totales, *Escherichia* y *Staphylococcus aureus* (Tabla 1).

Los coliformes totales, que reflejan las condiciones de higiene mantenidas

Tabla 1 - Media geométrica (\bar{x}_g), desviación estándar (s) y rango de variación para recuento de coliformes totales, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en 67 muestras de queso de campo.

Símbolos: *N.D. = No se detectó

Parámetros estudiados	Coliformes totales/g	<i>Escherichia coli/g</i>	<i>Staphylococcus aureus/g</i>
\bar{x}_g	$2,25 \times 10^4$	$5,68 \times 10^2$	$5,26 \times 10^3$
s	245	47	192
Rango de variación	*N.D. a $4,60 \times 10^6$	N.D. a $7,50 \times 10^5$	N.D. a $6,45 \times 10^6$

durante el proceso de fabricación, se detectaron en un 98,5% de las muestras alcanzando un valor promedio de $2,25 \times 10^4$ /g (Tabla 1), con un amplio rango de variación entre ellas. Al considerar la distribución de las muestras según su rango de concentración de microorganismos coliformes (Tabla 2), se aprecia que sólo un 1,49% de ellas presentó cifras inferiores a 10/g, en tanto el mayor porcentaje se agrupó en el rango de 1.000 a 1.000.000/g, encontrándose en un 13,43% de los quesos recuentos superiores a esta cifra. Brodsky (3) en Canadá para quesos del tipo Cheddar, elaborados con leche cruda, encontró en un 25,4% de las muestras una media geométrica de 82,3 coliformes/g, no detectándolos en un 70,3% de los quesos. Por su parte Arispe & Westhoff (1), en Queso Blanco de Venezuela, obtuvieron una media geométrica de $7,9 \times 10^5$ coliformes totales/g, cifra algo superior a nuestros resultados. Las diferencias numéricas encontradas por estos autores demuestran la influencia de las condiciones higiénicas durante el procesamiento, sobre el recuento de microorganismos coliformes.

Tabla 2 - Rango de concentración de coliformes totales y *Escherichia coli* em 67 muestras de queso de campo.

Símbolos: *N.M.P. = Número más probable; **N.D. = No se detectó

*N.M.P. de bacterias/g	Coliformes totales		<i>Escherichia coli</i>	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
< 10	1	1,49	13	19,40
11 - 100	4	5,97	13	19,40
101 - 1000	6	8,96	9	13,43
1001 - 10000	11	16,42	10	14,93
10001 - 100000	19	28,36	17	25,37
100001 - 1000000	17	25,37	5	7,46
sobre 1000000	9	13,43	N.D.**	N.D.
Total	67	100	67	100

E. coli estuvo presente en un 89,5% de los quesos con una cifra promedio de $5,68 \times 10^2$ /g (Tabla 1). Este valor promedio es similar al obtenido por Lick & Dunkeld (11) en Sudáfrica y al de Ottogalli & col. (16) en Italia, pero en quesos fabricados con leche pasteurizada. Nuestro valor promedio fue sin embargo inferior a lo encontrado por Arispe & Westhoff (1), quienes obtuvieron una cifra promedio de

$3,16 \times 10^5$ /g. En un trabajo realizado en Chile, con queso de cabra de elaboración artesanal, se encontró que un 100% de las muestras contenían coliformes fecales, y en un 85% de ellas los valores sobrepasaban los 1.000/g (15). Nuestros resultados están por lo tanto indicando que, si bien hay un elevado número de muestras con presencia de *E. coli*, su cifra promedio no es muy alta. Sin embargo al igual que para coliformes totales, se observó aquí un rango de variación muy amplio entre los resultados de las diferentes muestras (Tabla 1). En efecto, se pudo observar un 19,41% de muestras con cifras de *E. coli* inferiores a 10/g, encontrándose por otro lado un 32,83% de los quesos con valores entre 10.000 y 1.000.000/g (Tabla 2). Este amplio rango de variación ha sido también observado por otros autores (5, 11) y puede atribuirse a factores como el tiempo de maduración, la carga bacteriana inicial, las condiciones higiénicas durante la fabricación, etc. (5, 6).

Con frecuencia se han encontrado en quesos, cifras similares de recuento para coliformes totales y fecales obteniéndose incluso, valores idénticos para ambos grupos bacterianos (3, 5). Este hecho pudo también ser comprobado en nuestro trabajo en un 15% de las muestras, lo cual podría estar indicando una muy alta contaminación por organismos fecales en ciertos quesos.

En un 77,6% de las muestras fue aislado *Staphylococcus aureus*, alcanzando un valor promedio de $5,26 \times 10^3$ /g (Tabla 1). Su presencia en el alimento significa un peligro potencial para los consumidores, ya que muchas cepas son productoras de enterotoxina. Se requiere sin embargo el haber alcanzado una concentración mínima de 10^6 células por gramo de muestra para que se presente riesgo de una toxinfección (21). Al observar la Tabla 3 se aprecia que en nuestro trabajo el 13,49% de las muestras sobre pasa este valor. Debe tenerse en cuenta que en aquellos quesos con cifras inferiores, al darse las condiciones necesarias, puede llegar a multiplicar la bacteria y alcanzar rápidamente los valores mencionados.

Existen diversos factores que influyen sobre el desarrollo de *S. aureus* en productos como el queso de campo. Entre ellos está el número inicial de células viables presentes, debido a que esta bacteria compite muy mal frente a otros microorganismos (21); un alto porcentaje de humedad que favorece al desarrollo de la bacteria (9), aislándose por ello preferentemente a partir de quesos blandos (1), lo cual correspondería a los estudiados; el tiempo de maduración dado al producto, ya que en un buen proceso de fabricación los microorganismos del tipo coliformes totales y fecales, así como *S. aureus*, tienden a disminuir durante ese período (6, 9). Cabe hacer notar que el tipo de queso analizado sólo tiene una maduración aproximada de 10-20 días antes de salir al mercado, lo cual es un aspecto desfavorable. Es de importancia también el cultivo láctico, ya que una rápida multiplicación de éste impide la proliferación de bacterias contaminantes como *S. aureus* (9).

Se ha señalado en la literatura que entre un 9,1% y un 23% de *S. aureus* aislados de queso son toxígenicos, encontrándose en su mayoría, cepas productoras de enterotoxina tipo A (1, 7). Sin embargo se requieren de ciertas condiciones en el alimento, tales como temperatura, pH, humedad, cantidad de oxígeno, para que éstas puedan producir la toxina. Por lo general los factores que afectan el desarrollo de la bacteria también influyen sobre la producción de toxina (19).

S. aureus tiene importancia además como indicador de contaminación proveniente de personas portadoras, lo cual ocurriría durante el proceso de fabricación (2, 9, 20), sin embargo en este estudio, probablemente la mayor fuente de contaminación esté dada por la materia prima, ya que diversos trabajos realizados en el país revelan una alta prevalencia de mastitis clínica y subclínica en vacas de lechería

Tabla 3 - Rangos de concentración de *Staphylococcus aureus* en 67 muestras de queso de campo

Recuento de <i>S. aureus</i> /g	Número	Porcentaje
< 2000	21	31,35
2001 - 10000	9	13,43
10001 - 100000	13	19,40
100001 - 1000000	15	22,39
sobre 1000000	9	13,49
Total	67	100

(4, 10, 17, 22), encontrándose a *S. aureus* entre los principales agentes de esta patología (17, 18).

El Reglamento Sanitario Chileno de los Alimentos (14) no permite la presencia de *E. coli* ni de *S. aureus* coagulasa positivo en quesos, sin hacer mención al tiempo mínimo de maduración requerido ni establecer diferencia entre quesos elaborados con leche cruda o pasteurizada. Con ello de acuerdo a nuestros resultados, un muy bajo porcentaje de las muestras estarían cumpliendo con las exigencias. Collins-Thompson & col. (5) en Canadá proponen un límite más flexible para ese país, con un máximo de 500 coliformes fecales/g y de 1.000 *S. aureus*/g para quesos fabricados con leche pasteurizada, con valores de 1.000 coliformes fecales/g con un máximo de 10.000 *S. aureus*/g para quesos elaborados a partir de leche no pasteurizada. Tanto en Canadá como en algunos otros países se exige sin embargo un período mínimo de maduración de 60 días para los quesos elaborados con leche no pasteurizada (3). Por otro lado Luck y Dunkeld (11) sugieren un estándar local más severo de menos de 100 coliformes fecales/g para quesos de leche pasteurizada, con un mínimo de maduración de 4-8 semanas.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el queso de campo constituye un producto de riesgo para los consumidores por el gran número de muestras con cifras elevadas de microorganismos coliformes, *E. coli* y *S. aureus*. La presencia de estos gérmenes indicaría la posibilidad de encontrar bacterias patógenas como *Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium*, *Leptospira*, etc. A pesar de ser éste un producto de consumo frecuente, existe en nuestro país escaso control en la elaboración de él y debería por lo tanto solamente permitirse la venta de aquellos quesos que cuenten con la autorización pertinente.

Agradecimientos

Deseamos agradecer la colaboración prestada, en la recolección de las muestras, a las señoras Nieves Morales y Edith Hernández, del Laboratorio de Control de Alimentos, Servicio de Salud, Valdivia.

Referencias Bibliográficas

1. Arispe, I. & Westhoff, D. - Venezuelan white cheese: composition and quality. *J. Food Prot.*, 47:27-35, 1984.
2. Bennett, R.W. - In: - Food and Drug Administration - Bacteriological analytical manual. 5.ed. Washington, A.O.A.C., 1979.
3. Brodsky, M.H. - Bacteriological survey of freshly formed Cheddar cheese. *J. Food Prot.*, 47:546-548, 1984.
4. Caballero, E.E. - Diagnóstico de mastitis mediante California Mastitis test. Chile, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, 1969. (Tesis).
5. Collins-Thompson, D.L.; Erdman, I.E.; Milling, M.E.; Burgener, D.M.; Purvis, V.T.; Loit, A. & Coulter, R.M. - Microbiological standards for cheese: survey and viewpoint of the Canadian Health Protection Branch. *J. Food Prot.*, 40:411-414, 1977.
6. Donnnett, T.W. - Studies on coliform organisms in Cheddar cheese. *Aust. J. Dairy Technol.*, 25:54-60, 1970.
7. Donnelly, C.B.; Leslie, J.E.; Black, L.A. & Lewis, K.H. - Serological identification of enterotoxigenic Staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, 15:1382-1387, 1967.
8. Dos Santos, E.C.; Genigeorgis, C. & Farver, T.B. - Prevalence of *Staphylococcus aureus* in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. *J. Food Prot.*, 44:172-176, 1981.
9. Dos Santos, E.C. & Genigeorgis, C. - Survival and growth of *Staphylococcus aureus* in commercially manufactured Brazilian Minas cheese. *J. Food Prot.*, 44:177-184, 1981.
10. Gallo, C.B. - Relación entre recuento de células somáticas y tipo de bacteria

- causante de mastitis subclínica detectada por el California Mastitis test. Chile, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, 1977. (Tesis).
11. Lück, H. & Dunkeld, M. - Enterobacteriaceae in cheese. *Afr. J. Dairy Technol.*, 13:9-14, 1981.
 12. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) - Microorganisms in foods (1). 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
 13. Mackenzie, E.F.W.; Taylor, E.W. & Gilbert, W.E. - Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli* type I.J. *Gen. Microbiol.*, 2:197, 1948. In: - I.C.M.S.F. - Microorganisms in foods (1). 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
 14. Ministerio de Salud, República de Chile. - Reglamento Sanitario de los alimentos. Decreto nº 60 del 5/4/82.
 15. Nuñez, F.; Soto, B.; Gómez, L. & Leigh, J. - Calidad sanitaria del queso de cabra producido en la comuna de Til-Til. V Congresso Nacional de Medicina Veterinaria, Valdivia, Chile, Agosto, 1984. (Resumen).
 16. Ottogalli, G.; Rondinini, G. & Conti, D. - Coliformi, streptocochi fecali e test di sedimentazione in alcuni formaggi freschi. *Ann. Microbiol.*, 29:41-48, 1979.
 17. Quintas, J.F. - Control de mastitis a nivel predial. Chile, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, 1971. (Tesis).
 18. Raby, J.B. - Estudio bacteriológico en muestras de leche positiva al "California Mastitis Test" (C.M.T.). Chile, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile, 1969. (Tesis).
 19. Riemann, H. & Bryan F.L., eds. - Food-borne infections and intoxications. 2.ed. New York, Academic Press, 1979.
 20. Sheikh, M.I. & Luedecke, L.O. - *Staphylococcus aureus* in commercially processed fluid dairy and non-dairy products. *J. Milk Food Technol.*, 37:329-332, 1973.
 21. Tatini, S.R. & Jezeski, J.J. - Factors influencing the production of staphylococcal enterotoxin A in milk. *J. of Dairy. Sci.*, 54:312-320, 1971.
 22. Zurita, L.; Palavicino, I.; Cripe, W.S.; Timm, P. & Styles, J. - Contribución al estudio de la mastitis del bovino, formas de presentación y etiología más frecuente. *Arch. Med. Vet.*, 4:51-57, 1972.

EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCAR TOTAL E AERAÇÃO NO CRESCIMENTO DE CANDIDA UTILIS EM SUCO DE POLPA DE CAFÉ*

Sânia Maria Tauk

Deptº de Ecologia
Instituto de Biociências UNESP
Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

Resumo

Após os primeiros resultados do desenvolvimento de *Candida utilis* em suco de polpa de café, procurou-se verificar o efeito da concentração crescente de açúcar total e aeração no meio de cultura. Os diferentes cultivos foram realizados em condições constantes de temperatura a 30°C; agitação de 250rpm; aeração 1 e 2ppv; concentração de nutrientes, açúcar total: N:P igual a 40:1,0:0,1; pH 4,5 e o inóculo foi de 15% do volume final da cultura no fermentador. Foi realizado o crescimento de *C. utilis* em meio de melado, sob as mesmas condições de cultivo, para comparação dos resultados. A biomassa do microrganismo obtida em meio de suco de polpa de café teve menores teores de triptofano, lisina e proteína bruta do que aquela obtida em meio melado.

Summary

Effect of concentration of total sugar and aeration in the culture media

The liquid from coffee pulp was used as a culture medium for *C. utilis*, with the following characteristics: 5, 10, 30, 50g/l of total sugar; pH of 4,5, corrected with 0.1N HCl or 0.1N NaOH. Nutrients were provided by the addition of ammonium sulfate and phosphoric acid (40:1.0:0.1). These elutions were performed under constant conditions: temperature of 30°C; aeration of 1 or 2ppv; agitation 250rpm and inocula at 15%. Biomass; sugar content; total N and pH of culture medium were estimated over at 24hr period. In biomass rate of protein, triptophane, metionine and lisine were estimated. These results were compared with results obtained in molasses media.

Introdução

Na produção de leveduras primárias, vários substratos podem ser utilizados, dentre os quais se destacam: melacos, licor sulfítico, hidrolisados de madeira, resíduos e excedentes de frutas e vegetais, soros de indústrias de laticínios, vinhaça e hidrocarbonetos de petróleo.

Para a produção de leveduras em resíduos tem sido necessário o conhecimento dos fatores ambientais, que atuam no crescimento do microrganismo no substrato (2). Foram estudadas as condições necessárias em fermentador, para uma assimilação ótima

* Trabajo realizado no Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, Guatemala CA, com auxilio da CAPES.

Na Tabela 1 estão os resultados obtidos quanto ao rendimento (Y) e a velocidade específica (μ) de cada cultivo realizado de *C. utilis* em meios de suco de polpa de café e de melão.

O sobrenadante livre de célula dos diferentes cultivos foi analisado quanto aos teores de açúcar total, N total e pH (1). Em algumas amostras determinaram-se, qualitativa e quantitativamente, os açúcares presentes no suco de polpa e presença de etanol (1). Na biomassa obtida em meio de melão e de suco de polpa de café contendo 30g/l de açúcar total, foram determinados os teores de metionina, lisina e triptofano, através de método biológico (5) e o teor de N total (1).

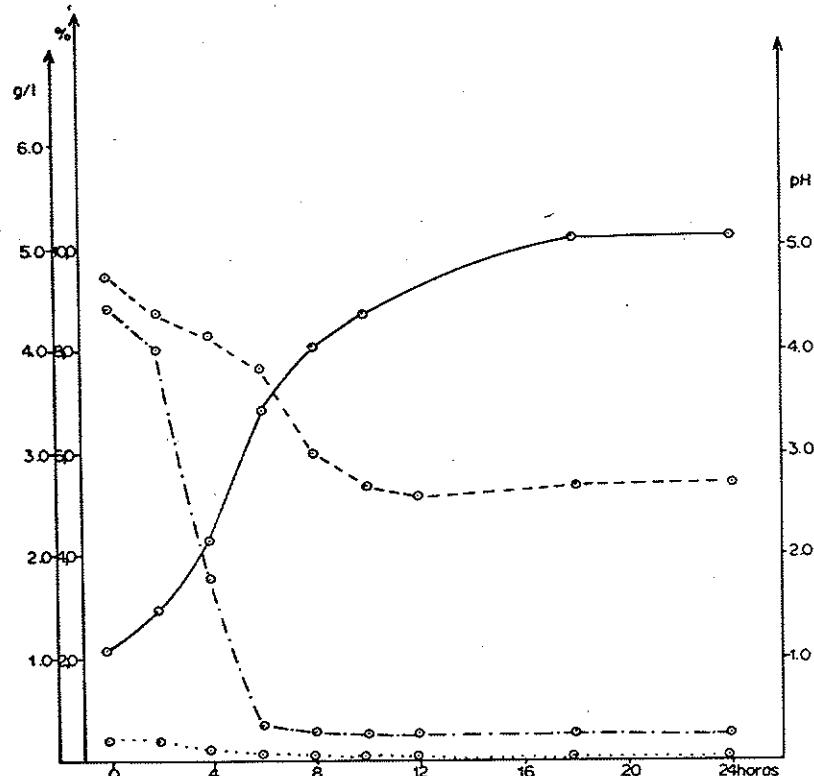
Utilizou-se o teste F, análise de variância e o teste LSD (17), para comparar as médias ao nível de $\alpha=0,05$.

Resultados

Os resultados encontrados no meio de suco de polpa contendo 10g/l de açúcar total estão na Figura 1, onde se demonstra a produção de biomassa de *C. utilis*, a alteração do pH, açúcar total e de N total no meio utilizado. A velocidade de crescimento dessa levedura, nessas condições, está citada na Tabela 1.

Figura 1 – Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 10g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1, Fermentador 1.

Símbolos: — = Biomassa; - - - = pH; - - - = Açúcar total e ... = N total



por microrganismos (8) e os requerimentos gasosos a fim de otimizar a utilização do substrato (18).

Decorrente de escassez de alimentos, tem sido proposta a utilização de fontes de alimentação não convencionais, caracterizando-as quanto à composição em aminoácidos e proteína (6), destacando-se entre elas, com algumas vantagens, a utilização de leveduras (7) e sendo revistos alguns métodos para remoção dos ácidos nucleicos da biomassa microbiana (14), por esses constituirem muitas vezes um fator limitante para utilização da levedura como alimento.

Tem sido proposta a utilização da polpa de café ou de seu suco na produção de proteína microbiana (3, 4, 13, 15). Entretanto, não tem sido estudada a viabilidade da utilização deste subproduto quando obtido em prensa hidráulica e de seu uso na produção de proteína, obtida a partir de levedura.

Estudos iniciais demonstraram que o meio de suco de polpa contendo relação de açúcar:nitrogênio:fósforo igual a 40:1:0,1 foi ideal para melhor crescimento de *Candida utilis* (19). Consequentemente, o objetivo do presente trabalho foi estabelecer um ótimo da concentração de açúcar e aeração do meio, para obtenção de maior quantidade de biomassa microbiana, uma vez que no estudo acima foi estabelecida uma concentração constante de açúcar total (5g/l).

Material e Métodos

A preparação dos inóculos, a pasteurização dos meios, o controle de contaminantes e as condições de cultivos foram citados anteriormente (19), excetuando a aeração aqui utilizada de 1 e 2ppv e a concentração de açúcar total crescente de 10, 30 e 50g/l, porém mantendo-se a relação de açúcar:nitrogênio:fósforo igual a 40:1:0,1. A capacidade do fermentador foi de 30 litros.

As fontes N e P foram respectivamente sulfato de amônia e ácido fosfórico (19); a composição do suco de polpa de café obtido na prensa hidráulica foi citada anteriormente (12).

Amostras de 100ml foram coletadas em tempos de 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 18 e 24 horas de cultivo, sendo as de zero horas com as seguintes composições: meio de cultura sem inóculo, meio de cultura com inóculo e o inóculo. Para cada amostra, foram utilizadas 3 réplicas. No final de cada cultivo, os meios foram concentrados em evaporador de líquidos, para testes futuros de alimentação animal.

Determinaram-se as biomassas de *C. utilis* produzidas nos diferentes meios de cultura, centrifugando-se as amostras em centrífuga refrigerada, a 8000rpm, a 5°C. As células resultantes foram lavadas em água destilada e novamente centrifugadas nas mesmas condições anteriores. Obteve-se o peso seco da biomassa colocando-se o material em estufa a vácuo, mantida a 60°C e, através dos resultados, determinou-se a velocidade de crescimento (μ) e o rendimento (Y).

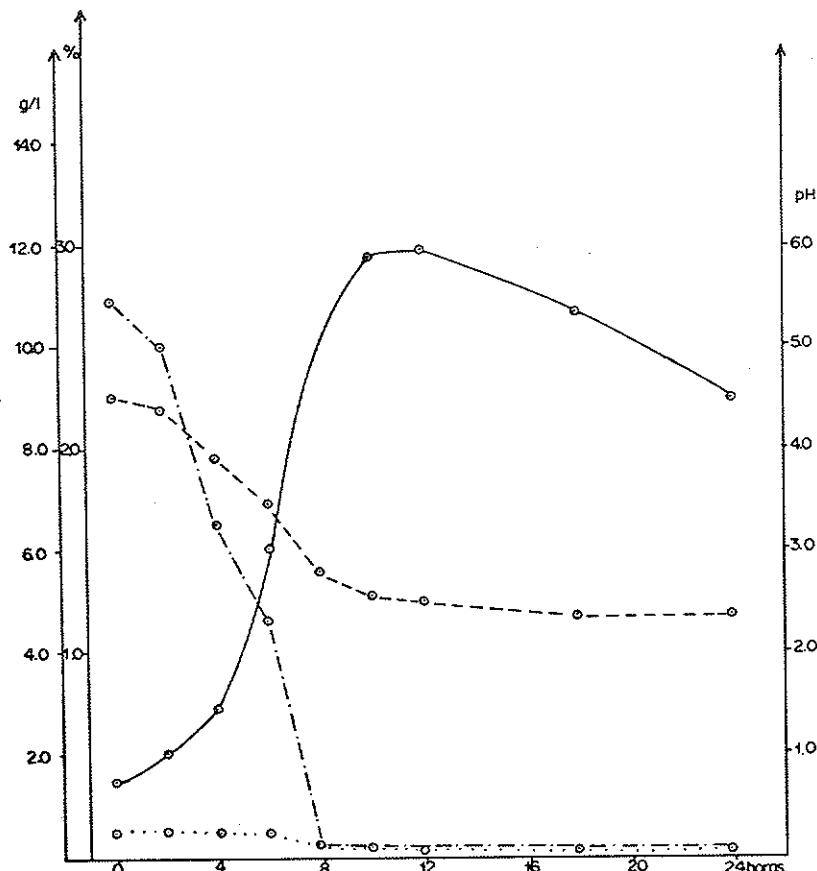
Tabela 1 - Determinação da velocidade específica de crescimento (μ) e do rendimento específico (Y) de produção de *C. utilis* em meio de suco de polpa de café com 10, 30 e 50g/l de açúcar total e suplementação de nitrogênio e fósforo, respectivamente, com sulfato de amônia e ácido fosfórico.

Símbolos: (a) suco de polpa de café; (b) melão

Açúcar total g/l	Aeração ppv	Rendimento específico (Y)		Velocidade específica de crescimento $\mu(h^{-1})$	
		(a)	(b)	(a)	(b)
10	1	0,36	-	0,212	-
30	1	0,29	0,25	0,260	0,203
50	1	0,21	0,25	0,150	0,155
50	2	0,12	0,26	0,370	0,210

Figura 2 - Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 30g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1.

Símbolos: — = Biomassa; - - - = pH; - - - - = Açúcar total e ... = N total



Esses mesmos fatores foram determinados em meios contendo 30g/l e 50g/l de açúcar total, mantendo-se as condições ambientais constantes e os resultados obtidos estão nas Figuras 2 e 3, onde os pontos representam as médias das réplicas utilizadas. As velocidades de crescimento do microrganismo nos diferentes cultivos estão citadas na Tabela 1.

A partir da curva de crescimento da levedura em meio de suco de polpa (Figura 3), aumentou-se a quantidade de aeração de 1 para 2ppv, repetindo-se o mesmo experimento e os resultados obtidos foram representados na Figura 4.

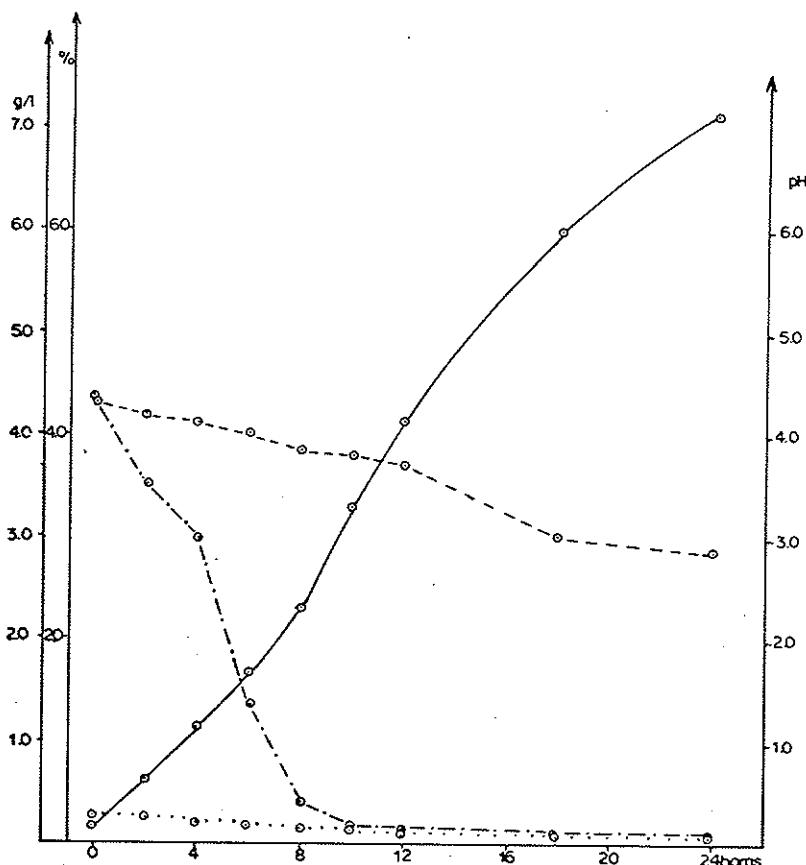
Para comparação dos resultados, realizou-se, sob as mesmas condições de cultivo, o desenvolvimento de *C. utilis* em melão contendo 30 e 50g/l de açúcar total, com aeração de 1 e 2ppv, respectivamente (Figuras 5 a 7).

Na Tabela 1 estão os resultados obtidos quanto ao rendimento (Y) e a velocidade específica (μ) de cada cultivo realizado de *C. utilis* em meios de suco de polpa de café e de melão.

Além dessas determinações, nas amostras de 24 horas, em algumas réplicas obtidas em sistemas onde a aeração foi deficitária, foram verificados traços de etanol,

Figura 3 - Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 50g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1.

Símbolos: _____ = Biomassa; ----- = pH; ... = Açúcar total e ... = N total



encontrando-se valores que variam de 0,43 a 1,34pv desse composto. Essas análises foram realizadas a partir do forte odor de álcool durante o desenvolvimento do microrganismo, principalmente em meio contendo 30g/l de açúcar total e aeração de 1ppv.

Na biomassa de *C. utilis*, obtida nos meios de melaço e de suco de polpa de café contendo 30g/l de açúcar total, foram determinados os teores de proteína bruta, metionina, triptofano, lisina e fósforo total, cujos resultados estão representados na Tabela 2. Os espectros obtidos no cromatógrafo de gás, para análise qualitativa e quantitativa dos açúcares presentes no sobrenadante livre de células, demonstraram a presença neste, de frutose, glicose e sacarose.

Os resultados foram transformados em números logarítmicos, devido ao número pequeno de amostra utilizado e aplicou-se o teste F, encontrando-se que pelo menos uma das médias de velocidade de crescimento foi diferente. Assim, utilizando-se o teste LSD, verificou-se a existência de diferenças significativas das médias de velocidade de crescimento em meios de suco de polpa de café contendo concentrações crescentes de açúcares totais. Comparando-se as velocidades obtidas em meio de suco

de polpa de café e de melaço no teste F, demonstrou-se que as médias das velocidades de crescimento da levedura em meio de suco de polpa, não diferiram significativamente daquelas obtidas com meio de melaço.

Discussão

A pasteurização dos meios de cultura, os nutrientes adicionados aos meios, o pH inicial e a temperatura de 30°C foram fatores ambientais utilizados devido aos resultados encontrados anteriormente (19) e por ter sido utilizado suco de polpa de café com a mesma composição química (12, 19).

Tabela 2 - Composição química da biomassa de *C. utilis*, obtida em meios de melaço e de suco de polpa de café, com 30g/l de açúcar total, aeração de 1ppv, agitação de 250rpm e temperatura de 30°C

Componentes	Meios de cultura	
	Suco de polpa de café	Melaço
Proteína bruta (%)	32,66	33,12
P total (%)	1,10	1,15
g/10g de proteína de		
Triptofano	0,73	1,09
Lisina	1,83	2,05
Metionina	1,01	1,21

Figura 4 - Cultivo de *Candida utilis* em suco de polpa de café com 50g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 2ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1.

Símbolos: — = Biomassa; - - - = pH; - - - - = Açúcar total e
... = N total

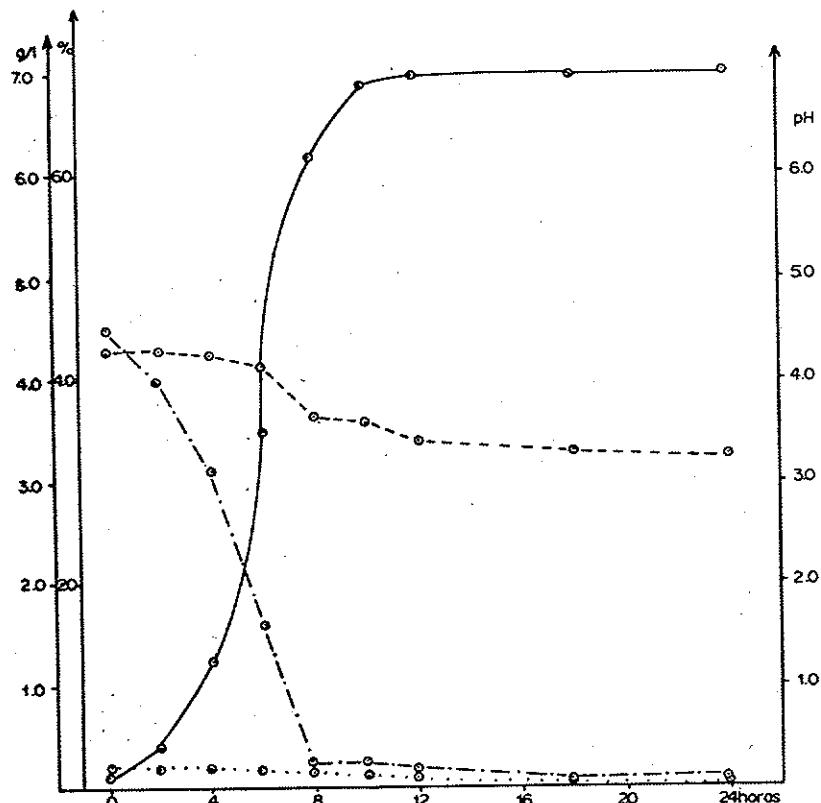
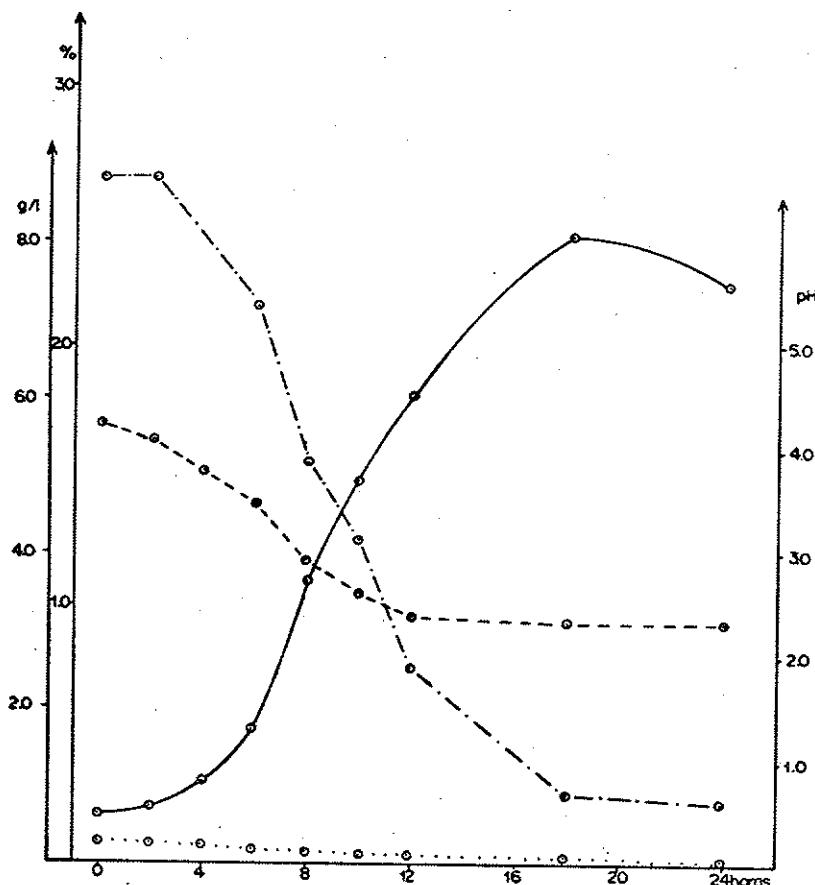


Figura 5 - Cultivo de *Candida utilis* em melaço com 30g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1.

Símbolos: — = Biomassa; - - - = pH; - - - - = Açúcar total e ... = N total



Quanto à produção de biomassa de levedura, verificou-se que a mudança de aeração de 1ppv para 2ppv produziu diferenças significativas em meio de suco de polpa de café, mas não as produzindo em meio de melaço. Admitiu-se que nesse último haveria necessidade de maior aeração do meio para melhor rendimento específico do processo.

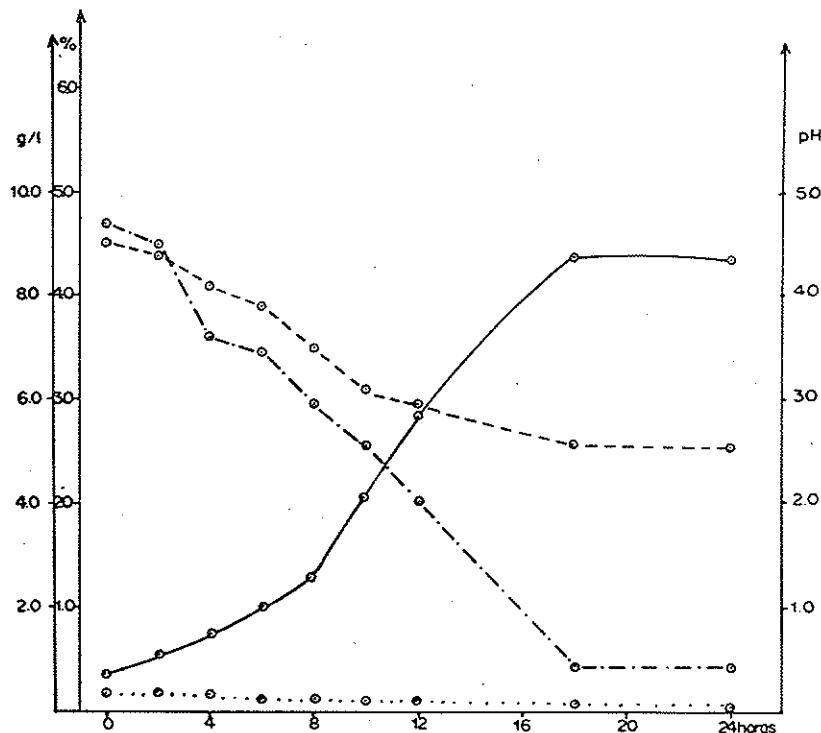
Outros experimentos com aeração maior nos fermentadores, nessas mesmas condições e no sistema utilizado, não foram possíveis, devido à grande formação de espuma e perda de células, mesmo utilizando-se sistema de refluxo, e mudança da posição da hélice do agitador dentro do fermentador.

Ressaltou-se, entretanto, que os resultados obtidos poderão ainda ser otimizados com o aumento do teor de oxigênio dissolvido no meio, pois foi evidenciado que o incremento de açúcar total no meio possivelmente requer aumento de oxigênio disponível, para acarretar melhor rendimento (Figura 7).

De acordo com os resultados obtidos, evidenciou-se que 8 horas de cultivo da levedura *C. utilis* em suco de polpa, foi o tempo ideal para a produção de biomassa. Foi observado que um tempo superior não possibilitou maior produção de células que justificasse um acréscimo no gasto de energia, exceto no experimento cujos

Figura 6 - Cultivo de *Candida utilis* em melaço com 50g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1.

Símbolos: _____ = Biomassa; ----- = pH; _____. = Açúcar total e ... = N total



resultados foram apresentados na Figura 3. Entretanto o acréscimo de oxigênio dissolvido, possibilitou a interrupção do processo no período de 8 a 10 horas.

Nos ensaios onde o sistema de aeração foi deficitário por qualquer falha do mesmo, detectou-se álcool no sobrenadante, podendo servir de indícios para abrir caminhos sobre a realização de fermentação alcoólica, a partir do suco de polpa de café ou da própria polpa.

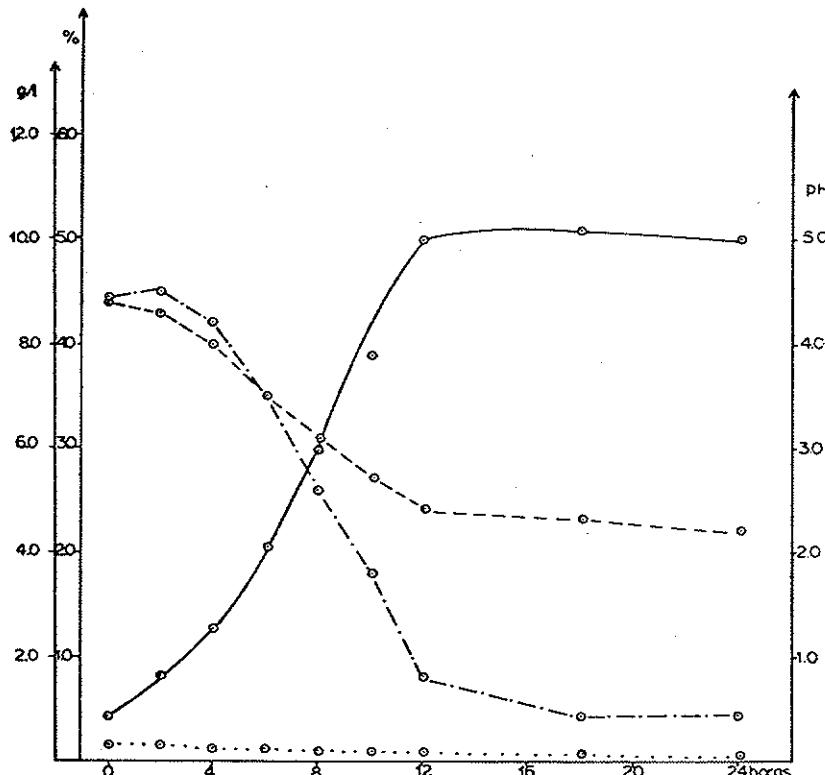
As células microbianas no final de cada experimento não foram separadas por centrifugação, preferindo-se a concentração do produto final, para posterior experimento, utilizando-se como ração animal, segundo a orientação da literatura (9).

Comparando-se a composição química da biomassa de *C. utilis* obtida em meio de melaço e no suco de polpa de café, verificou-se que os teores de proteína bruta, triptofano, lisina e metionina, foram menores naquela obtida em meio de suco de polpa de café. Entretanto, os teores encontrados são iguais àqueles obtidos em biomassa produzida a partir de glicose e hexadecano, utilizando-se o mesmo microrganismo (11). Apenas os teores de metionina, triptofano e lisina foram determinados, por serem esses aminoácidos de grande importância na alimentação animal e não sendo encontrados facilmente nos alimentos (10).

A determinação de proteína total e dos aminoácidos limitantes poderá ser uma forma rápida para selecionar proteína de alta qualidade, na busca de novos alimentos com alto valor proteico. Comparando-se os resultados aqui obtidos com

Figura 7 - Cultivo de *Candida utilis* em melado com 50g/l de carboidrato, pH inicial de 4,5, agitação de 250rpm, aeração de 1ppv, em temperatura de 30°C e composição de nutrientes de 40:1,0:0,1.

Símbolos: _____ = Biomassa; ----- = pH; ... = Áçúcar total e
... = N total



outros citados na literatura (16), verificou-se que 0,24g de triptofano/100g de levedura (peso seco) constitui em valor superior ao encontrado para o milho, farinha de milho e grão de bico.

Resumindo, o crescimento de *C. utilis* em meio de suco de polpa de café parece ser viável e poderá ser otimizado seu rendimento específico e velocidade, com adição de sulfato de amônia e ácido fosfórico e com aeração adequada para as condições de cultivo e composição do meio de cultura.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES pela bolsa ao exterior concedida em 1979, a qual tornou possível a realização desses estudos e a todo pessoal da Divisão de Microbiologia e Química Analítica do ICAITI, Guatemala, CA e em especial aos doutores Carlos Rolz, Sheryll Cabrera e J.F. Menchú.

Referências Bibliográficas

1. Association of Official Analytical Chemists - Official methods of analysis. 11.ed. Washington, D.C., 1970.
2. Arima, J.; Ogino, S.; Yano, K. & Tamura, G. - Studies on utilization of hydrocarbons of yeasts. *Agr. Biol. Chem.*, 29:1004-1008, 1965.
3. Calle, V.H. - Propagación de leveduras alimenticias en la pulpa y mucilago del café. *Rev. Cafet. de Colombia*, 10:3730-3732, 1951.
4. Calle, V.H. - Ensayo sobre cultivo de leveduras alimenticias en la pulpa de café. *Cent. Nasc. de Invest. de café, Colombia, Bol. Inform.*, 2:33-36, 1951.
5. Difco Manual - Análise microbiológica de aminoácidos e vitaminas. Cat. 08/78:1-15, 1978.
6. Ghose, T.K. - Foods of the future. *Process Biochem.*, 4:43-46, 1969.
7. Humbert, E.S. - Yeast utilization. *Tech. Quarterly*, 8:221-224, 1971.
8. Lefrançois, L. & Revuz, B. - Conditions in fermenter necessary for obtaining optimal assimilations. *Biotechnol. & Bioeng. Symp.*, 4:559-564, 1973.
9. Pajunen, E.; Vanhatalo, I.; Linko, M. & Pessa, E. - Concentration of yeast extract with a centrifugal film evaporator. In: - Proc. IV Inter. Congress Food Sci. and Technol., 4:390-396, 1974.
10. Pirt, S.J. - Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publ., 1975.
11. Powel, M.E. & Robe, K. - Food process. In: - Algae, bacteria, and yeasts as food or feed. Critical Review in Food Technology, Thomas E. Furia, The Chemical Rubler, 1:259-262, 1970.
12. Rolz, C. - Producción de biomassa de productos renovables. I - Obtención de jugo de pulpa de café: informe técnico. ICAITI Guatemala, p.78-118, 1978.
13. Rolz, C.; Espinosa, R.; Cabrera, S.; Maldonado, O. & Menchú, J.F. - Growth of filamentous fungi on agricultural waste: continuous culture. 6 - Application and new fields. London, Soc. of Chem. Ind. In: - Inter. Symp. on Continous Culture, p.100-115, 1976.
14. Sinskey, A.J. & Tannenbaum, S.R. - Removal of nucleic acid in SCP (single-cell protein). In: - Single-cell protein. 2.ed. Cambridge, Cambridge Press, p.158-178, 1975.
15. Sood, S.M.; Sethi, R.P.; Sharma, B.N. & Ghai, S.K. - Utilization of coffee waste as a source of carbon for the production of fungal protein (SCP). *J. Res. Agric. Univ.*, 16:69-73, 1979.
16. Sotelo López, A.; Rio, A.M.O. del & Rodriguez-Fuentes, M. - Contenido de lisina disponible y triptófano en concentrados proteicos. *Arch. Invest. Med.*, 3:77-90, 1972.
17. Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. - Principles and procedures of statistics. New York, Mc Graw-Hill, 1960.
18. Topiwala, H.H. & Hamer, G. - A study of gas transfer in fermenters. *Biotechnol. & Bioengin. Symp.*, 4:547-557, 1973.
19. Tauk, S.M. - Efeito da adição de nitrogênio e fósforo no crescimento de *Candida utilis* em suco de polpa de café. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 16:188-197, 1985.

NITROGENASE ACTIVITY OF A NEGATIVE NITRATE REDUCTASE *BEIJERINCKIA DERXII* GROWN IN A ORGANIC CARBON LESS MEDIUM

Heloiza Ramos Barbosa

Instituto de Ciências Biomédicas USP
 Deptº de Microbiologia
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 05508 São Paulo SP, Brasil

Yara N.F. Struckel

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Umuarama
 Caixa Postal 22
 87500 Umuarama PR, Brasil

& Renato C. de Almeida Filho

Instituto de Química USP
 Deptº de Bioquímica
 Caixa Postal 20780
 01498 São Paulo SP, Brasil

Summary

A nitrogen-fixing, free-living bacterium, identified as *Beijerinckia derxii* subsp. *venezuelae* was isolated from cerrado soil and some of its physiological characteristics were studied. The organism did not exhibit nitrate reductase activity. Incubation in a carbon and nitrogen free medium revealed that its nitrogenase remained active up to 100 hours and that the number of viable cells only began to fall after 170 hours.

Resumo

Atividade de nitrogenase de *Beijerinckia derxii* nitrato redutase negativa cultivada em meio livre de carbono orgânico

Uma bactéria fixadora de nitrogênio, de vida livre, identificada como *Beijerinckia derxii* subsp. *venezuelae* foi isolada de solo coberto por vegetação de cerrado. O estudo de algumas de suas características fisiológicas mostrou que o microrganismo não apresenta atividade de nitrato-nitrito redutase; a incubação em meio isento de carbono e de nitrogênio indicou que a atividade da nitrogenase permanecia durante cerca de 100 horas e que o número de células viáveis começava a diminuir por volta de 170 horas.

Introduction

Beijerinckia derxii subsp. *venezuelae*, a nitrogen fixing, free-living, aerobic bacterium, isolated from soil covered with the cerrado type of vegetation is able to grow in acid media (1) and calcium is not required for growth and nitrogen fixation (2). These properties make it quite adaptable to the environmental conditions mentioned above. It is also able to synthesise reserve material either as extracellular slime or as β -hidroxibutirate granules (2).

B. derxii can grow in ammonia and N_2 as nitrogen sources, but nitrate utilization as sole nitrogen source is not well defined. Peña and Döbereiner (8) demonstrated in some species of *Beijerinckia* that the values of nitrogenase activity in

nitrate-medium were intermediate between that of complete inhibition (ammonia medium) and no inhibition at all (N_2 medium). These results are suggestive of some degree of nitrate utilization. Becking (2) proposed as weak or absent the *Beijerinckia* capacity of nitrate assimilation.

In the present paper some of the physiological characteristics of *B. derxii* are studied, namely, the survival and the persistence of nitrogenase activity in a carbon-free and nitrogen-free medium. The possible presence of a nitrate-nitrite reductase system is also investigated.

Material and Methods

Source of material - Samples of the upper layers of the soil from the cerrado region of Enas, Pirassununga SP, Brazil. This region was chosen because it has been the object of many ecological studies and consequently it has been better known than other cerrado areas.

Isolation of the microorganisms - In a silica gel medium, the soil was inoculated according to the Winogradski method (5). Samples of about 10mg, previously dried, were pressed into the medium and incubated at -30°C.

Culture medium - The isolated organisms were grown in the medium described by Peña and Döbereiner (8) for *Beijerinckia*, modified by the addition of 0.008g $CoCl_2 \cdot 2H_2O$, 20.0g of glucose in place of sucrose and 12.0g of agar, when necessary. For experiments with fixed nitrogen, the above medium (N_2 medium) was supplemented with 5, 10 or 15mM of KNO_3 (nitrate-medium) or with 10mM of $(NH_4)_2SO_4$ (ammonia medium). Salt and sugar solutions were autoclaved separately, in individual flasks at 120°C for 40 minutes.

Identification - The microorganisms isolated were sent to the "American Type Culture Collection", Maryland, USA, for identification. The tests included morphology, pigment and pellicle formation and the following biochemical assays: gluconate oxidation, production of urease and tryptophanase (indole), growth in pH 3.5 and 8.5. Utilization of sources of carbon: fructose, glucose, methyl-D-glucoside, glycerol, maltose, melezitose, sucrose, raffinose, melibiose, trehalose.

Growth and nitrogenase activity determinations on nitrate medium - Ten erlenmeyer flasks (250ml capacity) containing 50ml of nitrate medium were inoculated and incubated at 30°C with agitation. Samples were taken daily from the contents one flask for the counting of colony-forming units (C.F.U.), reading of turbidity (Absorbance on Coleman Jr. at 550nm) and measurement of the nitrogenase activity by the acetylene reduction method (8).

NO_3^- consumption - The amount of nitrate remaining on the liquid medium originally containing 10mM of KNO_3 , at different stages of growth was measured by the method of Cataldo & col. (4).

Nitrogenase inhibition by methylamine - Tubes containing either nitrate medium, N free medium or NH_3 medium, with and without 0.1% methylamine (10) sterilized by filtration, were prepared. After inoculation and incubation of the culture at 30°C, the presence or absence of growth was observed after periods of 3-7 days.

Growth and nitrogenase activity in the absence of carbon and nitrogen sources - 0.3ml of a 4-day culture in a complete N_2 medium were inoculated in tubes containing 8.0ml of carbon free and N-free medium. Growth was followed by daily readings of Absorbance at 550nm. Concomitantly, a sample of the culture was utilized for the determination of nitrogenase activity. The number of C.F.U. of the cultures was determined at intervals varying from 3 to 4 days.

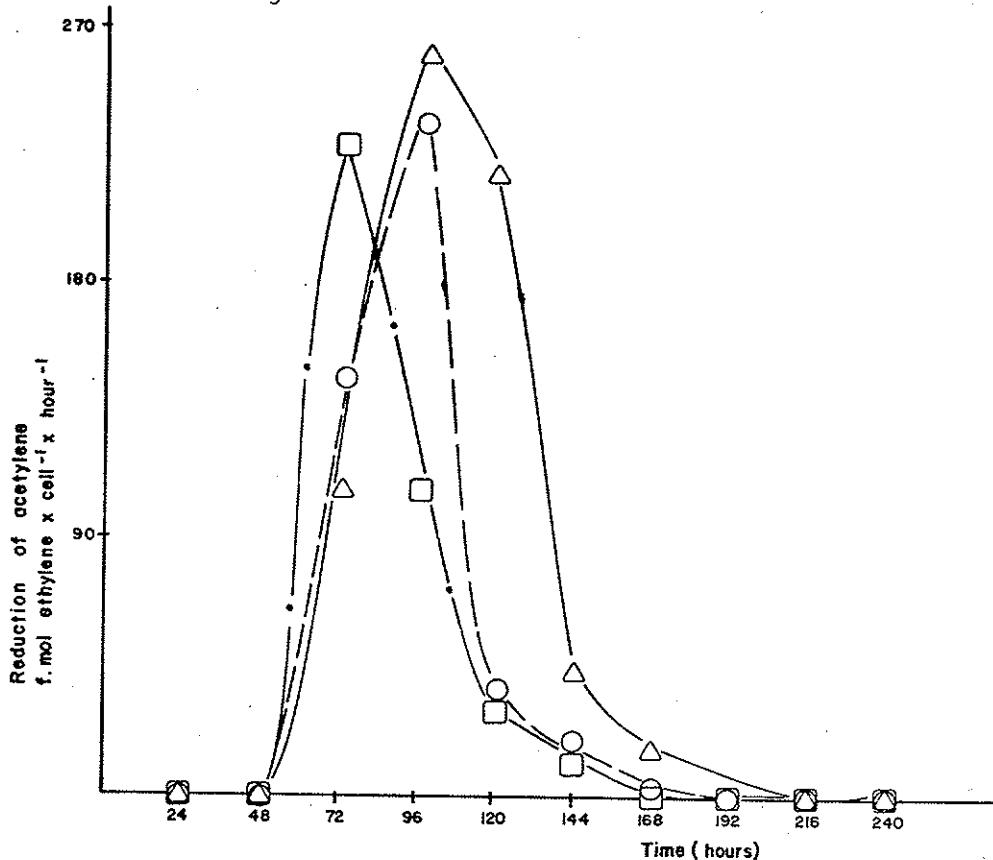
Results

Tests for identification - The bacteria grew under aerobic conditions and several media deficient in nitrogen. Growth in nitrogen-free liquid media resulted in a pellicle and after 2-3 weeks, a fluorescent pigment was detected in the broth. The viscosity of the culture increased until the entire culture assumed a semisolid consistency. The cells were gram-negative non-motile rods. Two large refractile polar bodies were present after only a few days incubation and these varied in size, sometimes within the same cell. The bodies stained with Sudan Black, indicating a lipid composition.

Biochemical tests - Gluconate oxidation (weak), urease (-), indole (-), growth at pH 8.5 (+) and pH 3.5 (-). Carbon utilization in nitrogen-free media: fructose (+); glucose (+); methyl-D-glucoside (+); glycerol (-); maltose (+); melezitose (+); sucrose (+); rafinose (+); melibiose (+); thehalose (-). The bacterium was identified as *Beijerinckia dertxii*, and as subsp. *venezuelae* because of its ability to grow at pH 8.5, but not at pH 3.5.

Growth and nitrogenase activity in nitrate medium - The nitrogenase activity was not inhibited by the increased nitrate concentration used (Fig. 1). The amount of growth as assessed by the number of C.F.U. was similar whether the medium contained nitrate or not (Fig. 2).

Figure 1 - Nitrogenase activity measured by f-moles of ethylene produced as a function of the time in population grown with 200g/l of glucose and (O) 5, (□) 10 and (Δ) mM of KNO_3



NO_3^- consumption - The nitrate concentration in the culture medium remained unchanged throughout the period of growth, indicating the inability of *B. dervixii* to use nitrate as a nitrogen source.

Nitrogenase and growth inhibition by methylamine - The addition of methylamine completely inhibited the growth of *B. dervixii* in all tested media, i.e., N_2 , nitrate and ammonia.

Growth and nitrogenase activity in the absence of carbon and nitrogen sources - Nitrogenase remained active until 96 hours after inoculation, with a four-fold increase in the first 24 hours (Table 1). Growth, as assessed by absorbance at 550nm, exhibited a maximum increase of four to five times the initial values. The number of C.F.U. increased 20-30 times. The C.F.U. number also increased during the incubation period by 20-30 times.

Discussion

Considering the acidity of the cerrado soil (7), the presence of bacteria of the genus *Beijerinckia* is not surprising since it is well suited to grow in poor soils under native vegetation; one of the main features of this genus is its restricted distribution to tropical and in a lesser degree, subtropical soils (1).

The capacity to use nitrate as a nitrogen source has been observed in various nitrogen-fixing bacteria (6, 9). As a consequence of nitrate permeation, the nitrogen fixation is inhibited (13). The mere presence of nitrate, however, is not sufficient for this inhibition because the organism must possess an active nitrate-nitrite reductase system. Sorger (11) observed that the nitrate, which may be used by *Azotobacter vinelandii* as an alternative nitrogen source, inhibited the nitrogenase in this organisms. In nitrate reductase (NR) negative mutants, however, such inhibition did not occur and organisms fixed N_2 in the presence of nitrate.

The results presented in this paper seem to favour this hypothesis in the case of *Beijerinckia dervixii*. Apparently it does not possess a nitrate-reductase system since the amount of nitrate present in the culture medium remained unchanged

Figure 2 - Growth curves measuring the number of colony-forming units as a function of the time in two different conditions (□) medium containing nitrate (15mM) and (○) medium containing N_2 as nitrogen sources

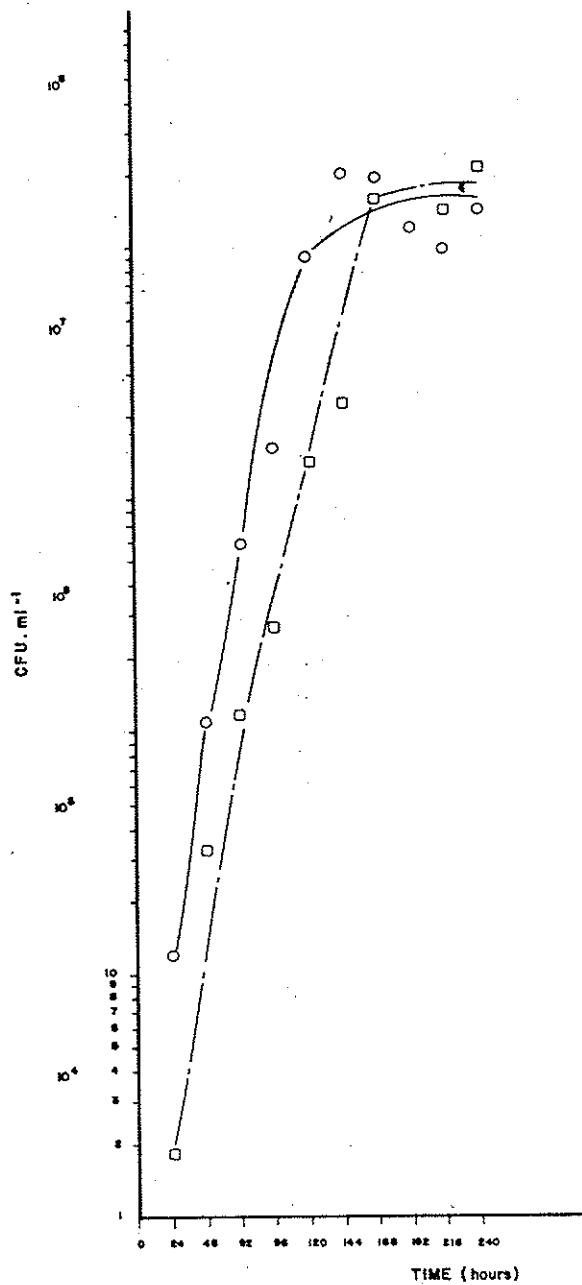


Table 1 - Determinations of nitrogenase activity by the acetylene reduction method and growth by absorbance and by C.F.U. number in function of time in a population maintained in a carbon-free and nitrogen free medium.

Symbols: N.d. = Not determined

Age of culture hr	Nitrogenase activity p. moies of ethylene $\text{min}^{-1} \cdot \text{5ml of culture}^{-1}$	Absorbance (550nm)	C.F.U. number 5ml^{-1}
0	130.0	.025	6.0×10^6
24	540.0	.066	n.d.
48	56.0	.106	n.d.
72	6.5	.109	n.d.
96	3.6	.096	1.8×10^8
168	zero	.090	1.4×10^9

during all growth phases. The organisms are as a matter of fact, quite indifferent to the presence or absence of nitrate since the yields measured by number of C.F.U. are quite similar as also are the measurements of nitrogenase activity in different nitrate concentrations (Fig. 1).

The growth of *B. deryxi* was inhibition by methylamine in the presence of ammonia and glucose. The same effect was observed by St John and Brill (12) when methylamine was added to the *Azotobacter vinelandii* culture in the presence of glucose or maltose as the sole carbon source. This fact suggests that these substances can act in vital points before repressing nitrogenase.

The presence of a nitrate-reductase system enabling the bacteria to use NO_3^- is of utmost importance. It permits the use of an alternative nitrogen source, increasing the bacterial potentiality when nitrogenase is inhibited by some environmental factor as an excess of oxygenation. On the other hand, the bacteria, in the presence of nitrate, loose their nitrogen fixing capacity and behave like the non fixing flora, as consumers of fixed nitrogen in soil, shunting it from use by the covering vegetation. An increase in the number of C.F.U. was observed. This may be explained by an actual multiplication of the bacteria or another possibility is the dispersion of bacterial aggregates due to the decrease in the viscosity of the slime (3). Perhaps both occur simultaneously.

The four fold increases in nitrogenase activity observed in the first twenty four hours in the carbon-free and nitrogen-free medium (Table 1) may be ascribed to an enzyme synthesis. Microscopic observation revealed a significant decrease in the number and size of the polar granules. There was also decrease in the viscosity of the medium, probably due to the breakdown of the slime polymers. This indicates that the reserve material accumulated as poly β -hydroxybutyrate (2) inside the cell and as slime outside, are quite able to supply the large amounts of energy necessary for the synthesis and activity of the nitrogenase.

These data demonstrate that *B. deryxi* isolated from a poor and acid soil is able to survive "in vitro" by a number of days and keep nitrogenase activity in a less favorable condition.

Acknowledgements

We are indebted to Dr. Alaides P. Ruschel for technical assistance and advices, to Dr. Lucio P. de Carvalho Lima for useful discussions and revision of the manuscript. We thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo for the grant-in-aid.

References

1. Becking, J.H. - Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I - Geographical and ecological distribution in soils. Plant Soil, XIV:49-81, 1961.
2. Becking, J.H. - Gram negative aerobic rods and cocci Family II - Azotobacteraceae e Pribam 1933, 5. In: - Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p.253-261, 1974.
3. Bergensen, F.J. - Oxygen and the physiology of diazotrophic microorganisms. In: - Veegan, C. & Newton, W.E., eds. - Advances in nitrogen research Nijhoff-Junk. The Hague, p.171-180, 1984.
4. Cataldo, D.A.; Haroon, M.; Shrader, L.E. & Youngs, V.L. - Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. Commun Soil Science and Plant Analysis, 6:71-80, 1975.
5. Girard, H. & Rougier, R. - Techniques de microbiologie agricole. Paris, Dunod, 1958.
6. Magalhães, L.M.S.; Neira, C. & Dobereiner, J. - Nitrate and nitrite reductase negative mutants of N_2 fixing *Azospirillum* spp. Arch. Microbiol., 117:247-252, 1978.
7. Malavolta, E.; Sarruge, J.R. & Bittencourt, W.C. - Toxidez de alumínio e manganês. In: - VI Simpósio sobre o Cerrado. São Paulo, Ed. Universidade de São Paulo, p.275-301, 1976.
8. Peña, J.J. & Dobereiner, J. - Efecto del nitrato y amonio en la actividad de la nitrogenasa de bacterias tropicales fijadoras de nitrógeno atmosférico. Rev. lat.-amer. Microbiol., 16:33-44, 1974.
9. Sik, T. & Barabas, I. - The correlation of nitrate reductase and nitrogenase in *Rhizobium* symbiosis. In: - Newton, W.E.; Postgate, J.R. & Rodrigues Barrueco, C., eds. - Recent developments in nitrogen fixation. London, Academic Press, 1977.
10. Sorger, J.S. - Regulation of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii* O P and in a apparently partially constitutive mutant. J. Bacteriol., 95:1721-1726, 1968.
11. Sorger, J.S. - Regulation of nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii* O P: the role of nitrate reductase. J. Bacteriol., 98:56-61, 1969.
12. St John, R.T. & Brill, W.J. - Inhibitory effect of methylamine on glucose growth *Azotobacter vinelandii*. Biochem. Biophys. Acta, 261:63-69, 1972.
13. Wilson, P.W.; Hull, J.F. & Burris, R.H. - Competition between free and combined nitrogen in the nutrition of *Azotobacter*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 29:289-294, 1943.

EFEITO DE CULTURAS LÁTICAS SELEÇÃOADAS E TEMPERATURA DE MATURAÇÃO NO FLAVOR DO QUEIJO MINAS CURADO

José Giometti

Deptº de Morfofisiologia Veterinária
Fundação Universidade Federal do Piauí
Campus Universitário da Ininga
64000 Teresina PI, Brasil

Sebastião César Cardoso Brandão

Deptº de Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Viçosa
Campus Universitário
36570 Viçosa MG, Brasil

& Adão José Rezende Pinheiro

Deptº de Tecnologia de Alimentos
Universidade Federal de Viçosa

Resumo

Influência de combinações de *Streptococcus lactis* + *S. cremoris*, *S. lactis* + *S. cremoris* + *S. diacetilactis*, *S. thermophilus* + *Lactobacillus bulgaricus* + *S. faecalis* e *S. lactis* + *S. cremoris* + *S. faecalis* sobre o flavor do queijo Minas curado a 12°C e 28°C. A identificação e quantificação de acetaldeído, acetona, diacetil e etanol foram feitas por cromatografia gasosa. As concentrações de acetaldeído foram mais elevadas no período inicial de maturação. Para todas as combinações de microrganismos, as concentrações de etanol foram relativamente elevadas (5-50ppm). A concentração de diacetil foi maior em queijos maturados a 28°C, principalmente no período final. A população de mesófilos foi significativamente mais elevada na fase inicial do período de maturação, independentemente da temperatura. Os queijos elaborados com *S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *S. faecalis* curados a 12°C, apresentaram melhor flavor, embora suas características não fossem típicas do queijo Minas.

Summary

Effect of some selected lactic acid producing bacteria and the ripening temperature on the flavor characteristics of Minas cheese

Study the influence of combination *Streptococcus lactis* + *S. cremoris*, *S. lactis* + *S. cremoris* + *S. diacetilactis*, *S. thermophilus* + *Lactobacillus bulgaricus* + *S. faecalis*, *S. lactis* + *S. cremoris* + *S. faecalis* on the flavor of Minas cheese cured at 12°C a 28°C. The identification and quantification of acetaldehyde, acetone, diacetyl and ethanol were made by gas chromatography. Acetaldehyde concentration was higher in the initial ripening period. Ethanol concentration were relatively elevated (5-50ppm) for all combination of microorganism. Diacetyl concentration was higher for cheeses cured at 28°C, mainly at the final curing pe-

riod. The mesophilic bacteria and population was significatively greater at the beginning of the ripening period, independently of the curing temperature. Cheeses treated with *S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *S. faecalis*, cured at 12°C showed the best flavor, but the final characteristics were not similar to Minas cheese.

Introdução

A importância dos microrganismos láticos e a correlação entre alguns de seus metabólitos com o flavor típico do queijo, foram evidenciadas nas últimas décadas (13). Além disso, os conhecimentos disponíveis sobre os processos envolvidos na maturação dos queijos, permitem concluir que o flavor de cada variedade depende do tipo de maturação e que esta é dependente, entre outros, dos seguintes fatores: cultura láctica utilizada, população bacteriana do leite, enzimas adicionadas, condições de fabricação (15). A influência de algumas espécies mesófilas de bactérias lácticas sobre características do queijo Minas foi estudada recentemente (4). Considerando a grande importância econômica e alimentar do queijo, é ainda muito reduzido o conhecimento que se tem sobre a atuação dos diversos microrganismos lácticos no processo de maturação dos queijos nacionais e, em particular, com relação aos efeitos de seus produtos de metabolismo sobre a qualidade destes queijos.

Material e Métodos

O leite padronizado (3,2% de gordura) e pasteurizado (73°C/16 segundos), após resfriamento a 32°C foi adicionado de fermento láctico na proporção de 1% em relação ao leite. Culturas de *S. lactis*, *S. cremoris*, *S. diacetilactis*, *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* foram obtidas na forma liofilizada do Laboratório CHR, Hansen Ind. e Com. Ltda., enquanto que a cultura de *S. faecalis* var. STP-110.9 foi cedida pelo Dr. Theodore Hedrick (Michigan University, USA).

A fabricação do queijo Minas obedeceu metodologia tradicional para este tipo de queijo (14), considerando-se as culturas como tratamentos, I (*S. lactis* + *S. cremoris*), II (*S. lactis* + *S. cremoris* + *S. diacetilactis*), III (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *S. faecalis*) e IV (*S. lactis* + *S. cremoris* + *S. faecalis*). O experimento foi conduzido de acordo com um delineamento casualizado (7) e os queijos foram madurados a duas temperaturas: 12 e 28°C.

O período de maturação foi dividido em fases (inicial, intermediária e final), durante as quais foram realizadas as análises:

- Análise do aroma** - 50g da amostra de queijo foram homogeneizadas em liquidificador com 50ml de água destilada a 50°C. Do homogenato assim preparado transferiu-se 6g para o frasco "screw cap septum vials" de 20ml (Pearce Chemical, Co), o qual permaneceu em banho-maria a 65°C por 30 minutos. Com seringa "gastiht" (Hamilton, Co), transferiu-se 1,0ml de "headspace" para o injetor do cromatógrafo a gás (Varian, Co) modelo 3700, cujas condições de trabalho foram: temperaturado injetor 130°C, temperatura do detector (Dic) 300°C, temperatura da coluna 82°C, sensibilidade 10^{-12} , atenuação 4 e pressão do gás de arraste (nitrogênio) 37 psi. Foram usadas duas colunas unidas por junção: uma de 3m de comprimento empacotada com DEGS 10% e outra de 4m empacotada com 10% Tris (ciano etoxi) propano sobre Cromosorb 80% (Supelco, Inc.). As soluções p.a. padrões usadas foram acetona (Merck), etanol (Grupo Química), acetaldeído (Merck) e diacetil (Carlo Erba). Da mistura destes padrões, diluída a 1:10, retirou-se diferentes volumes, os quais foram transferidos para o frasco "screw cap septum vials", contendo 6g da amostra de queijo e este mantido em banho-maria a 65°C por 30 minutos. A quantificação dos compostos foi feita pela confecção da curva-padrão, na qual relacionou-se as alturas dos picos de cada composto no cromatograma, com a concentração em ppm (11).
- Análise microbiológica** - Para determinação da população de mesófilos, utilizou-se o método de semeadura de mistura de aliquotas das diluições decimais (1). Para a determinação da população de coliformes totais, usou-se o método de

diluições seriadas (1).

c) **Análise sensorial** - Os queijos maturados a 12°C e 28°C, foram analisados por um painel formado por cinco provadores treinados e a atribuição de pontos foi feita segundo a intensidade dos defeitos. Esta foi dividida em três categorias: sensível (S) definida (D) e pronunciada (P). A soma dos valores atribuídos aos defeitos foi subtraída do valor mínimo de cada categoria de atributos (12): flavor (45 pontos), corpo e textura (30 pontos), acabamento (15 pontos) e cor (10 pontos), perfazendo 100 pontos no total (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação sensorial de queijos

Produto Data avaliação	/ /	Data produção Tipo de painel	/ /
Fator	Valor máximo	Valor obtido	
Flavor	45		
Corpo e textura	30		
Acabamento	15		
Cor	10		
Total	100		
Defeitos de flavor		Defeitos de corpo e textura	
Ácido	SDP 975	Cortiça	SDP 432
Amargo	974	Friável	432
Silagem	986	Borrachamento	432
Fermentado/frutas	865	Olhaduras	321
Pouco sabor	987	Farináceo	432
Alho/cebola	641	Textura aberta	432
Aquecido	987	Pastoso	431
Mofado	753	Floculoso	432
Rançoso	641	Amolecido	432
Sulfídrico	974	Crosta anormal	432
Indeterminado	865		
Soro	875		
Levedura	841		
Defeitos de cor (internos): Esbranquiçado () Manchado ()			
Listrado () Linhas claras () Partículas brancas ()			
Defeitos externos (acabamento): Fendas na casca () manchas claras () Estufado () Mofado () Disformes () Furos de com posição () Superfície desigual () Crosta esbranquiçada ()			

Resultados e Discussões

A Figura 1 representa um cromatograma típico do queijo Minas curado. As concentrações de acetaldeído foram significativamente maiores no início da maturação do queijo (Tabela 2). Os queijos do tratamento III (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *S. faecalis*) apresentaram os níveis mais elevados de acetaldeído na

Figura 1 - Cromatograma da amostra de queijo Minas curado

Resposta do Detetor

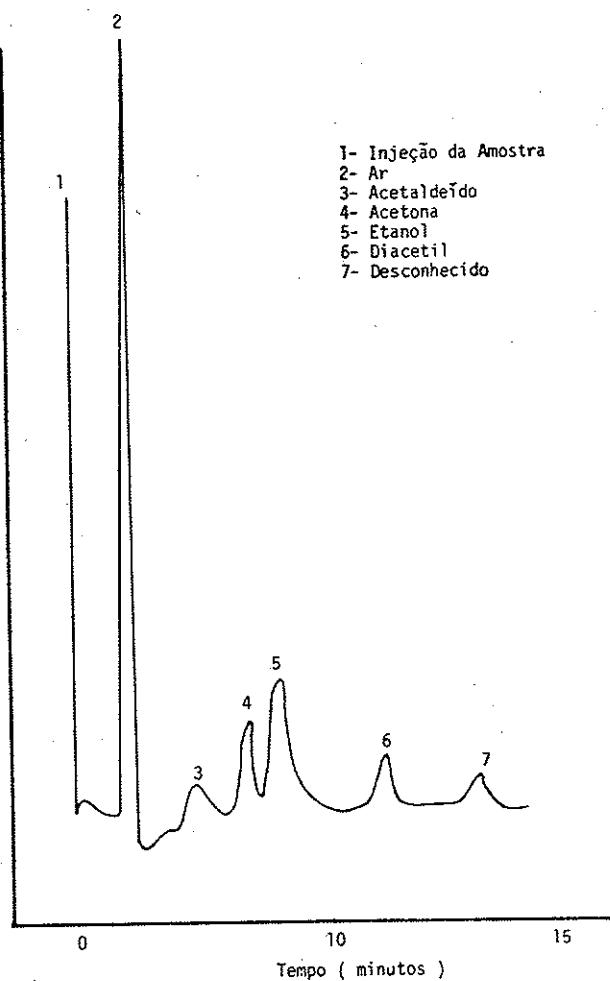


Tabela 2 - Resumo das análises de variância dos resultados obtidos relativos à produção, em ppm, de acetaldeído, acetona, etanol e diacetil, pelo queijo Minas curado.

Símbolos: * = Significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$); ns = Não-significativo a 5% de probabilidade ($P > 0,05$)

Fontes de variação	Graus de liberdade	Quadrados médios			
		Acetaldeído	Acetona	Etanol	Diacetil
Tratamento (T)	3	4,756561 ns	0,021239 ns	283,007324 ns	13,275757 ns
Fase de maturação (F)	2	19,092468 *	0,163824 ns	114,557587 ns	10,289848 ns
Temperatura (M)	1	4,468896 ns	1,093987 ns	0,113853 ns	3,359268 ns
T x F	6	4,219055 ns	0,222199 ns	76,774536 ns	0,515444 ns
T x M	3	1,343676 ns	0,326167 ns	97,191559 ns	5,773682 ns
F x M	2	3,014967 ns	0,260385 ns	439,882324 ns	52,415192 *
Resíduo	57	2,567867	0,680576	172,068115	12,783430

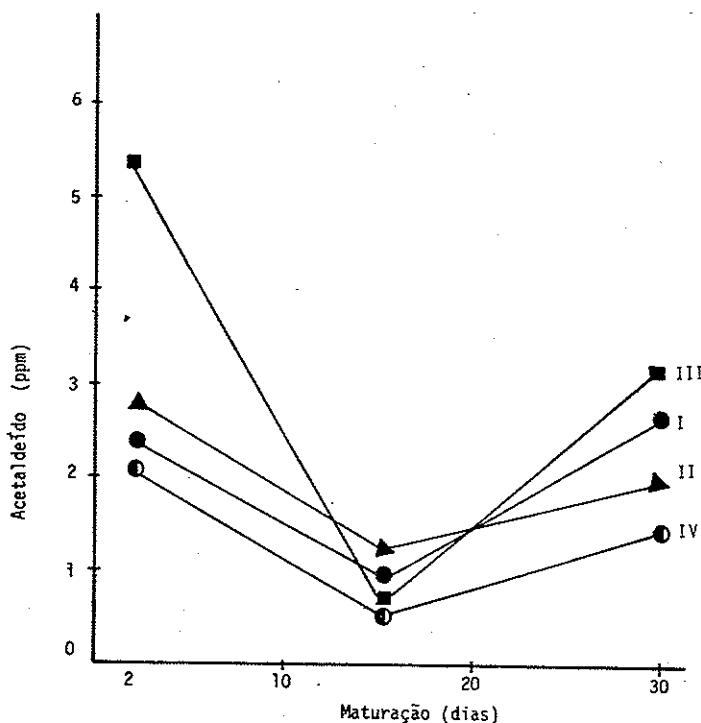
fase inicial (Figuras 2 e 3). As concentrações de acetona foram relativamente baixas em todos os tratamentos (Figuras 4 e 5), enquanto que as de etanol foram elevadas em ambas as temperaturas de maturação (Figuras 6 e 7). Os queijos maturados a 28°C apresentaram concentrações mais elevadas de diacetil na fase final da maturação, do que aqueles maturados a 12°C, sendo a diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade (Figuras 8 e 9).

Quanto a população de mesófilos, houve variação significativa com a fase de maturação do queijo, sendo mais elevada na fase inicial, do que na intermediária e final. O crescimento bacteriano foi maior nos queijos maturados a 28°C (Figuras 10 e 11). A pesquisa de coliformes totais foi realizada durante a primeira semana de maturação e eles estiveram ausentes neste período.

A análise sensorial mostrou que os queijos do tratamento III apresentaram melhor flavor quando a maturação ocorreu a 12°C, vindo em segundo lugar os queijos do tratamento I (*S. lactis* + *S. cremoris*) maturados a 28°C (Figura 12).

Os resultados sugerem que as culturas lácticas desempenham papel significante sobre o processo de maturação do queijo Minas curado, influenciando na produção de compostos aromáticos envolvidos na formação do flavor e do corpo e textura do queijo. Os queijos do tratamento III (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus* + *S. faecalis*) não apresentaram as características de flavor e de corpo e textura típicas do queijo Minas curado, embora tenham desenvolvido o melhor flavor. Seu sabor era levemente adocicado, textura mais aberta e consistência mais macia, sugerindo a ocorrência de uma simbiose ainda não estudada entre os microrganismos (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *S. faecalis*) no queijo. O flavor resultante dessa simbiose, mostrou-se bem definido e foi constatado em todas as repetições, sendo que a sua descoberta promete ser o primeiro passo para o surgimento de um novo queijo, com grande possibilidade de aceitação comercial.

Figura 2 - Concentrações de acetaldeído em queijo Minas curado à temperatura de 12°C



Os queijos do tratamento I (*S. lactis* + *S. cremoris*) apresentaram flavor, corpo e textura típicos do queijo Minas curado.

A adição de outros microrganismos, que não os da cultura láctica tradicional, ao leite empregado na elaboração do queijo Minas curado mostrou ser uma tentativa válida, para obter-se o melhoramento do produto. *S. faecalis*, graças à maior capacidade de adaptação ao meio e grande atividade proteolítica (10) e *L. bulgaricus*, pela produção de acetaldeído (5), podem melhorar o flavor e o corpo e textura do queijo durante a maturação. *S. faecalis*, durante algum tempo foi considerada como provável fator etiológico de toxinfecções alimentares. Todavia, estudos mais recentes demonstraram, experimentalmente, que voluntários mantidos com vários alimentos contaminados com doses maciças deste microrganismo (cerca de 10^{10} células/g) não apresentaram quaisquer sintomas de toxinfecção (6).

A concentração de acetaldeído na fase inicial de maturação tem grande importância na formação do flavor (9) e a sua conversão a etanol, indesejável se for elevado o seu teor durante a maturação, é realizada pelo sistema álcool-desidrogenase das bactérias (13). As mais elevadas concentrações de acetaldeído correspondem os mais baixos níveis de etanol (2). A presença do diacetil durante a maturação é fator fundamental para favorecer a aceitabilidade do queijo (8). A temperatura de maturação influí na formação deste composto. A população bacteriana nos queijos maturados a 28°C mostrou tendência de crescimento, sugerindo a presença de bactérias contaminantes.

Figura 3 - Concentrações de acetaldeído em queijo Minas curado à temperatura de 28°C

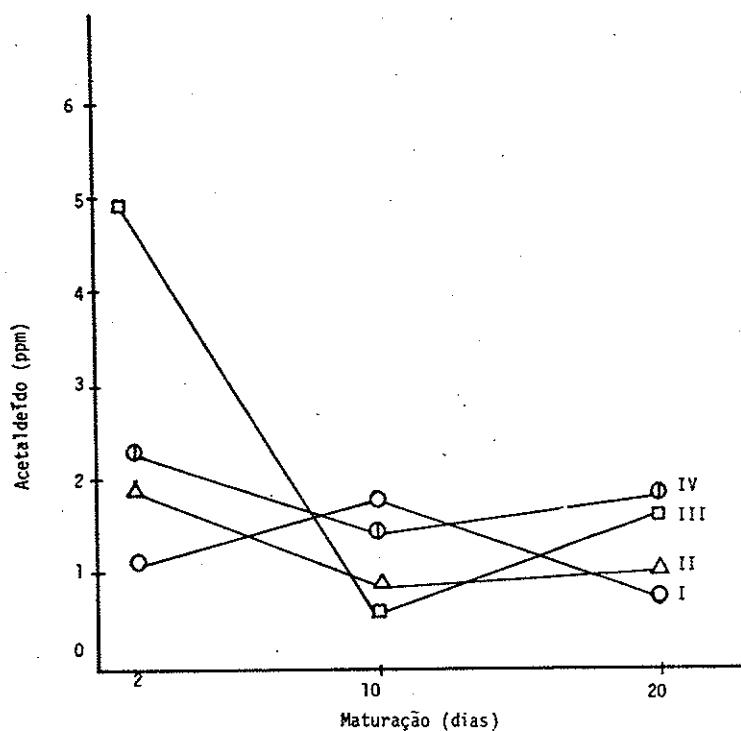


Figura 4 - Concentrações de acetona em queijo Minas curado à temperatura de 12°C

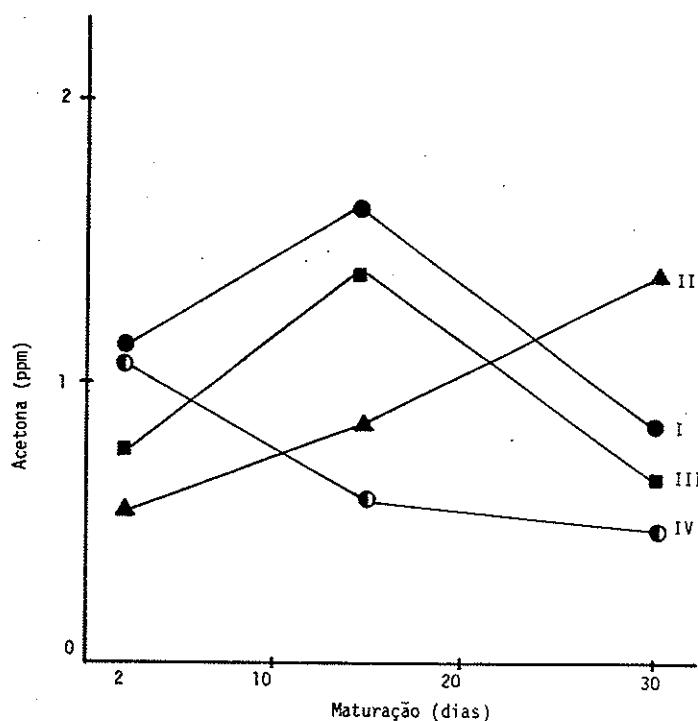


Figura 5 - Concentrações de acetona em queijo Minas curado à temperatura de 28°C

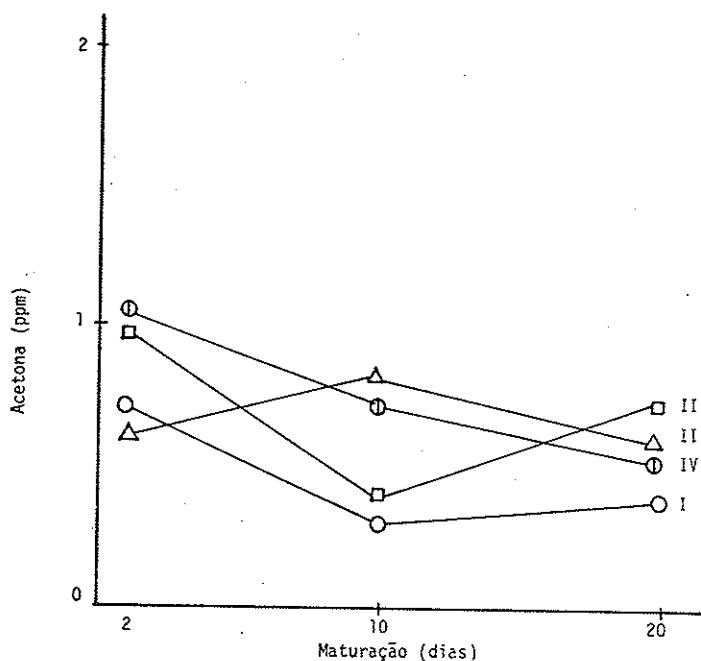


Figura 6 - Concentrações de etanol em queijo Minas curado à temperatura de 12°C

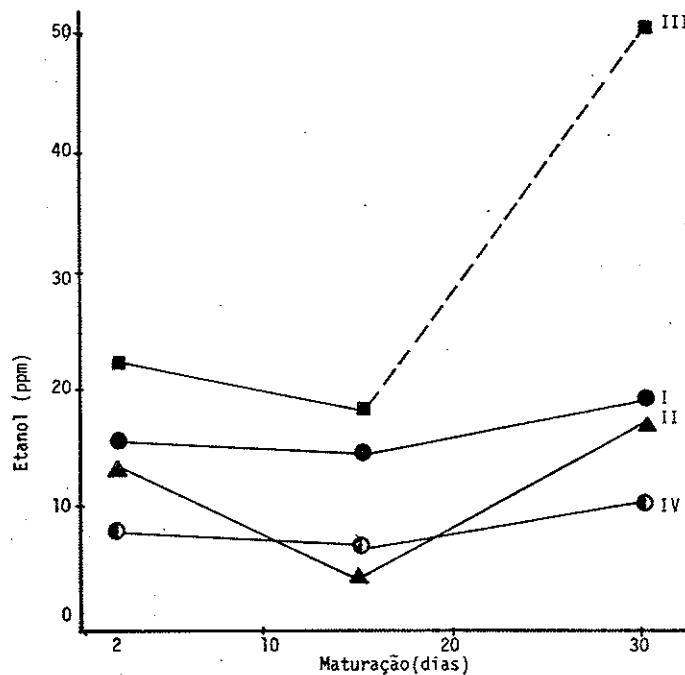


Figura 7 - Concentrações de etanol em queijo Minas curado à temperatura de 28°C

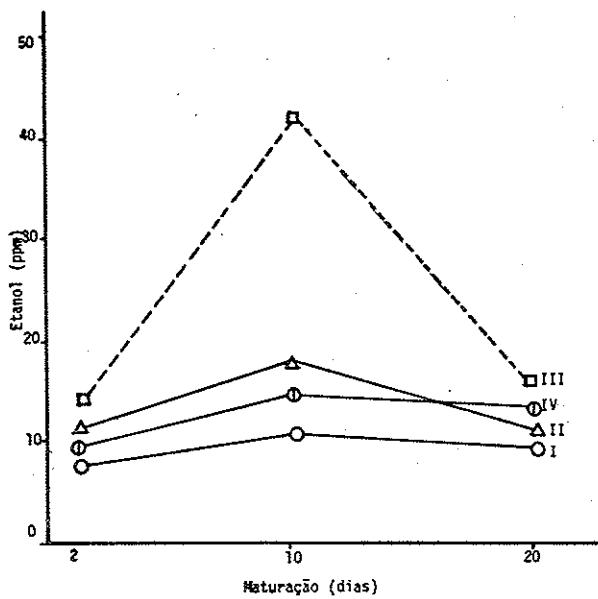


Figura 8 - Concentrações de diacetil em queijo Minas curado à temperatura de 12°C

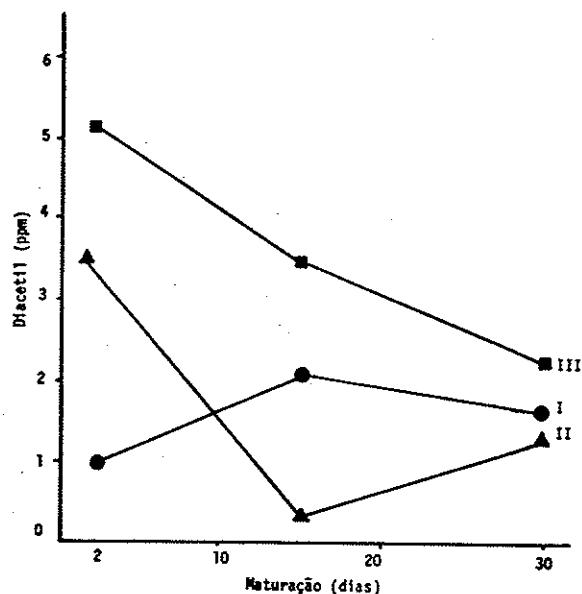


Figura 9 - Concentrações de diacetil em queijo Minas curado à temperatura de 28°C

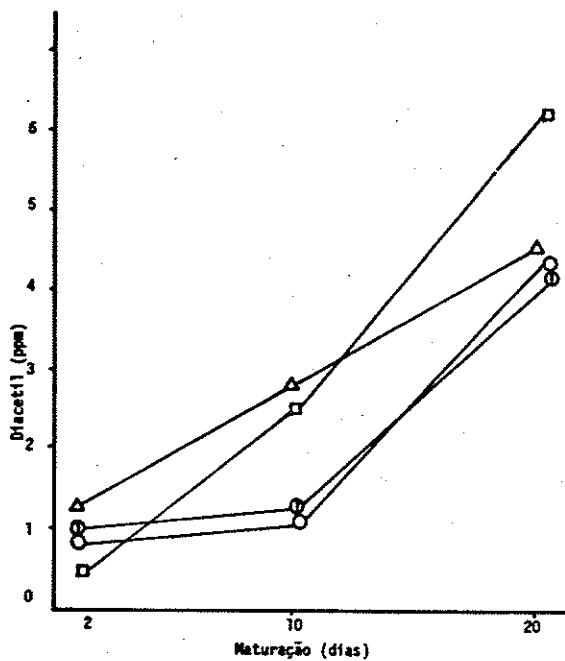


Figura 10 – População média de mesófilos em queijo Minas curado à temperatura de 12°C

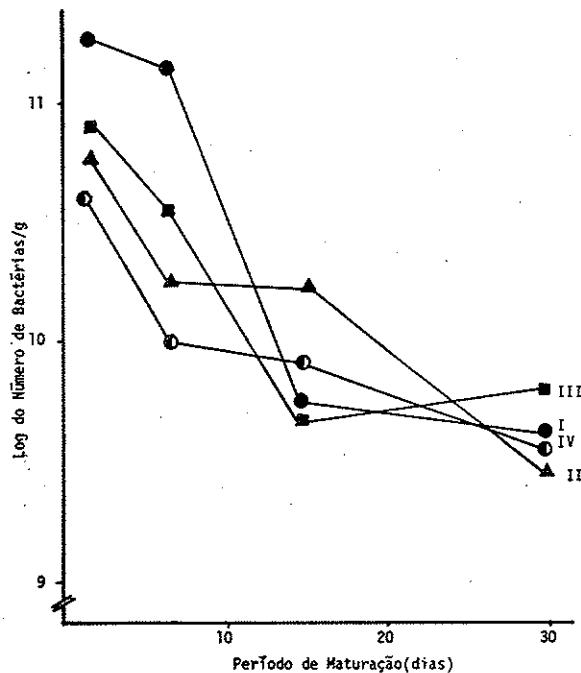


Figura 11 – População média de mesófilos em queijo Minas curado à temperatura de 28°C

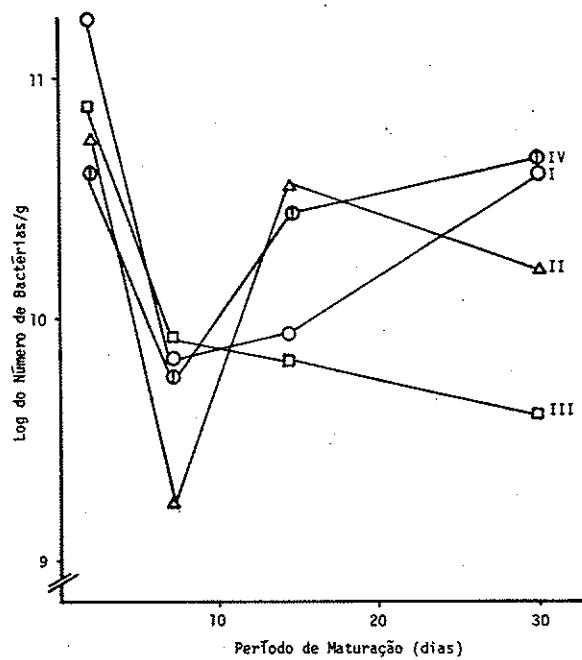
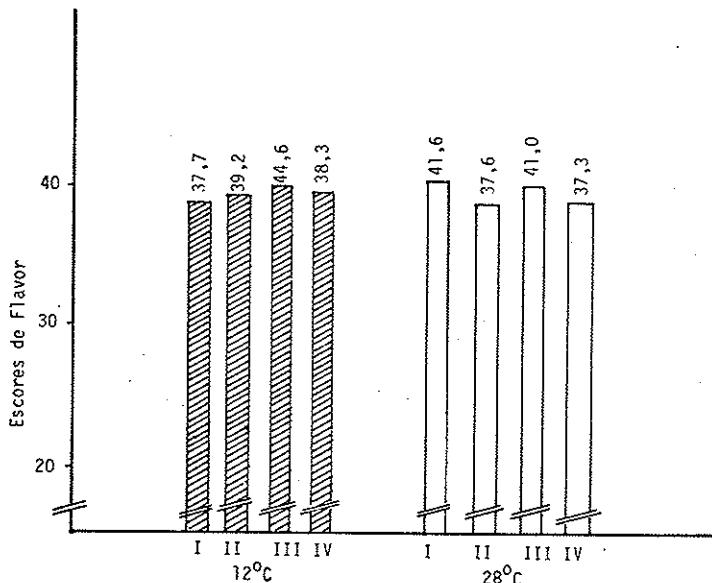


Figura 12 - Escores de flavor do queijo Minas curado



Referências Bibliográficas

- American Public Health Association - Standard methods for the examination of dairy products. 14.ed. Washington, 1978.
- Bills, D.D. & Day, E.A. - Dehydrogenase activity of lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 49:1473-1477, 1966.
- Bills, D.D.; Morgan, M.E.; Libbey, L.M. & Day, E.A. - Identification of compounds responsible for fruity flavor defect of experimental Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.*, 48:1168-1173, 1965.
- Bonassi, I.A.; Cury, P.R. & Goldoni, J.S. - Estudo comparativo da influência de algumas espécies de bactérias lácticas mesófilas nas características do queijo Minas. *Boletim da SBCTA (Campinas)*, 17:380-390, 1983.
- Brandão, S.C.C. - Determination of volatile flavor constituents and residual carbohydrates during the fermentation of yogurt. Michigan State University, 1980. (These Ph.D.).
- Frazier, W.C. & Westhoff, D.C. - Food microbiology. 3.ed. New York, Mc Graw-Hill Book, 1978.
- Gomes, F.P. - Curso de estatística experimental. 5.ed. São Paulo, Nobel, 1973.
- Hempenius, W.L.; Liska, B.J. & Harrington, R.B. - Consumer preferences for flavor in creamed cottage cheese. *J. Dairy Sci.*, 48:870-876, 1965.
- Keenan, T.W.; Lindsay, R.C.; Morgan, M.E. & Day, E.A. - Acetaldehyde production by single-strain lactic streptococci. *J. Dairy Sci.*, 49:10-15, 1966.
- Kosikoweski, F.V. - Cheese and fermented milk foods. 2.ed. Ann Arbor, Edwards Brothers, 1977.
- McNair, H.M. - Cromatografia de gases. Washington, Secretaria General de la OEA: monografia nº 23, 1981.
- Nelson, J.A. & Trout, G.M. - Judging dairy products. 4.ed. Milwaukee, Wisconsin, the Olsen Publishing, 1964.
- Schormuller, J. - The chemistry and biochemistry of cheese ripening. In: - Advances in food research. New York, Academic Press, p.232-334, 1968.
- Velloso, C.R.V. - Ocorrência de brucelas no leite e seu comportamento durante o processamento e cura de queijos Minas padronizado e mussarela. Viçosa, UFV, Impr. Univ., 1984. (Tese MS).
- Wong, N.P. - Cheese chemistry. II - In: - Fundamentals of dairy chemistry. Connecticut, Avi Westport, p.719-753, 1974.

ERRATA

PSEUDOMONAS AERUGINOSA COMO AGENTE CAUSAL DE ABCESSO EM SERPENTE (BOTHROPS NEWIEDI). REVISTA DE MICROBIOLOGIA, 17(1): 28-30, JAN./MAR. 1986.

ONDE SE ENCONTRAR

pg. 28 1º autor
Sofia Calixto

pg. 28 Resumo 3ª linha
Pseudomonas aeruginosa

pg. 28 Introdução 3º parágrafo, 4ª linha
Crotalus

pg. 29 Resultados e Discussão 3º parágrafo
lesões marinhas

LEIA-SE

Sofia Calixto Mavridis

Pseudomonas aeruginosa

Crotalus

leões marinhas

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Antiviral research: an international journal, (5)3, Jan. 1984. 2 volumes 12 números/ano US\$ 93.00.

Como o próprio nome diz esta nova revista é destinada a artigos originais ou de revisão no campo do controle das infecções virais em animais, no homem, nos vegetais e em organismos inferiores.

Seus objetivos vão desde os mecanismos de resistência natural e adquirida à infecções virais, respostas imunes celulares e/ou humorais a infecções por vírus, quimioterapia interferon, desenvolvimento de novas formas de vacinas e caracterização de抗ígenos até trabalhos de campo envolvendo quimioterapias antivirais.

Thereza L. Kipnis
 Deptº de Imunologia
 Instituto de Ciências Biomédicas USP
 Prédio ICB-III
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

CENDOTEC - Centro Franco-Brasileiro de Documentação Técnica e Científica

Órgão ligado ao Ministério de Relações Exteriores, tem por objetivo divulgar, naquele país, textos que abordam as realizações brasileiras nos campos da ciência, ao mesmo tempo que, divulga no Brasil artigos das áreas científicas e técnicas da França.

O CENDOTEC possui ainda acervo de documentação técnica e científica (livros, revistas, index, listas de endereços) e dispõe em Paris de uma Célula de Apoio que auxilia em toda e qualquer pesquisa, mesmo que não possua a informação em seu acervo, uma vez que sua rede de informações está ligada a todos os bancos de dados. Essa Célula de Apoio auxilia o CENDOTEC quando este não dispõe de elementos de resposta suficientes para satisfazer a uma solicitação local, fornecendo assim, informações tanto para a França como para o Brasil.

Para maiores informações:

CENDOTEC
 Av. Waldemar Ferreira, 204
 Tel. (011) 212-7855 e 212-4572
 05501 São Paulo SP

Tânia Valí Dantas
 Sociedade Brasileira de Microbiologia
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

Informes Técnico-Científicos sobre Infecções Hospitalares

A série Informe Técnico-Científicos foi criada pela Comissão Permanente de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) com a finalidade de veicular informações sobre vigilância epidemiológica e sobre infecções hospitalares, no âmbito da instituição.

Tabela 1 - Comparação de percentuais de amostras resistentes a drogas ocorridas na enfermaria do HC de Botucatu (1980-1984) e computadas pelo Sistema COBA SBM-MSD em 1984 (dados globais e dos Laboratórios de Referência).

Símbolos: * SUM = Sulfatrimetoprim; AMP = Ampicilina; TETRA = Tetraciclina; CLORA = Cloranfenicol; CEFAL = Cefalotina; CEFOX = Cefoxitina; GENTA = Gentamicina; NETIL = Netilmicina; AMICA = Amicacina; AC.NIL = Ácido nalidixico; OXA = Oxacilina; ERITRO = Eritromicina; ** HC = Enfermaria do HC da Fac. Medicina de Botucatu; CO = Sistema COBA/1984 (dados globais); LR = Sistema COBA/1984 (dados dos Laboratórios de Referência)

Bactérias	Drogas*			SUM			AMP			TETRA			CLORA			CEFAL			CEFOX		
	Origen**			HC	CO	LR	HC	CO	LR	HC	CO	LR	HC	CO	LR	HC	CO	LR	HC	CO	LR
E. coli	71	51	46	83	68	60	81	73	68	77	48	58	72	38	29	0	7	4			
Klebsiella sp.	80	65	68	96	92	92	78	73	67	83	66	70	80	44	31	11	14	9			
P. mirabilis	63	48	39	58	60	49	100	95	95	73	46	36	46	41	30	0	19	7			
P. aeruginosa	95	89	86	96	97	97	87	91	86	90	85	81	98	96	99	100	91	96			
S. aureus	38	31	14	77	73	66	44	51	39	32	33	21	26	16	7	13	18	12			
	GENTA			NETIL			AMICA			AC.NIL			OXA			ERITRO					
E. coli	23	18	8	16	10	7	10	10	3	14	10	4	-	94	0	-	88	3			
Klebsiella sp.	73	50	60	64	38	47	22	24	23	20	19	16	-	96	-	-	95	-			
P. mirabilis	42	29	23	30	16	17	6	10	4	36	20	10	-	95	-	-	95	0			
P. aeruginosa	35	46	48	22	31	44	10	13	14	100	89	88	-	98	-	-	94	100			
S. aureus	31	28	16	25	13	13	8	19	10	-	74	44	24	29	23	46	40	28			

No primeiro número, editado este ano, encontram-se a transcrição parcial da Portaria nº 196, do Ministério da Saúde; critérios para identificação de infecção hospitalar e infecção comunitária; critérios para diagnóstico e classificação de infecção hospitalar em pacientes cirúrgicos; período de incubação de doenças passíveis de serem adquiridas em hospitais; e distribuição percentual de resistência bacteriana a drogas antimicrobianas, de gérmenes isolados em pacientes da enfermaria do HC, no período de 1980 a 1984.

A tabela a seguir, foi elaborada para comparação da distribuição percentual de resistência bacteriana, ocorrida no HC de Botucatu (1980-1984), e os percentuais de cepas resistentes, registrados em 1984, pelo Sistema COBA.

O sistema COBA foi criado pela SBM, em 1980, com o apoio do Serviço de Atualização Médica da Merck Sharp & Dohme, para gerar informações sobre bacteriologia clínica, a partir de resultados de antibiogramas, que são processados eletronicamente.

Os resultados de antibiogramas são fornecidos mensalmente por 100 laboratórios, hospitalares e não-hospitalares. Trimestralmente mais de 15 mil cepas são codificadas.

A Comissão Permanente de Controle de Infecção Hospitalar do HC de Botucatu é presidida pelo Dr. Augusto Cesar Montelli, também membro da Comissão de Análise do Sistema COBA.

Claudia Avanzi
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

International Biotechnology Directory. Second edition, 1985. US\$ 130.00.

Compilado por J.C. Combs, este diretório contém as principais entradas em biotecnologia: microbiologia industrial, engenharia genética, fermentação, biomassa, diagnósticos, etc.

Seu conteúdo está dividido em três partes. A parte I - Introdução à biotecnologia, contém informações sobre: a) organizações internacionais, envolvidas em biotecnologia, suas atividades e endereços, listadas alfabeticamente; b) Serviços de informação (base de dados, abstracts, newsletter em biotecnologia), listados alfabeticamente. A parte II - Perfis nacionais, contém atividades de agências governamentais, sociedades e associações, em biotecnologia, com endereços completos, listados por país. A parte III - Produtos e áreas de pesquisa, contém descrição geral de produtos, serviços e atividades de pesquisa em biotecnologia, em várias partes do mundo.

Engloba 4.000 organizações, entre comerciais e não comerciais, universidades, centros de pesquisas, listados por país.

Inclui ainda, nesta parte, um índice de classificação de produtos, listados em 14 categorias gerais, como: agricultura, sistemas analíticos e diagnósticos, energia, enzimas, fermentação, entre outros.

Ao final do livro, há um índice geral, alfabético, com referência cruzada.

Leila Vasconcellos

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cidade Universitária USP

05508 São Paulo SP

Journal of immunology methods: an international journal, (5)3, Jan. 1984. 20 números/ano US\$ 870.00.

Esta revista já clássica no campo da imunologia constitui o que de melhor se publica sob este aspecto.

Métodos destinados à: 1. Quantitação e detecção de anticorpos e/ou抗原s e haptenos baseados nas interações antígeno e anticorpo; 2. Fracionamento e purificação de imunoglobulinas; 3. Isolamento de抗原s e outras substâncias importantes nos processos imunológicos; 4. Marcação de anticorpos com várias substâncias; 5. Localização de抗原s e/ou anticorpos em tecidos e células "in vivo" e "in vitro"; 6. Detecção e numeração, fracionamento de células imunocompetentes; 7. Ensaio da imunidade celular; 8. Detecção de抗原s de superfície; 9. Tolerância; 10. Antigenos de transplantação; 11. Estudo de assuntos intimamente relacionados com imunidade tais como: complemento, sistema retículo endotelial, constituem assuntos de interesse para publicação.

Os editores e o corpo editorial da revista constituem um grupo de cientistas do mais alto gabarito de vários países, todos eles de renome em imunologia clínica e/ou básica.

Considerando-se que a imunologia é uma ciência situada na interface de várias outras e ainda mais que os métodos imunológicos têm hoje uma aplicação ilimitada em todas as áreas de biociências e biomedicina, o J.I.M. constitui periódico que deve fazer parte obrigatória de todas as bibliotecas.

Thereza L. Kipnis

Deptº de Imunologia

Instituto de Ciências Biomédicas USP

Prédio ICB-III

Cidade Universitária USP

05508 São Paulo SP

Papas, T.S.; Rosenberg, M. & Chirikjian, J.G., eds. - Gene amplification and analysis. Vol. III - Expression of cloned genes in prokaryotic and eukaryotic cells. New York, Elsevier, 286p., 1983.

Terceiro volume de uma série dedicada a difundir rapidamente informações sobre "Tópicos atuais em biotecnologia", o livro reúne contribuições de 63 autores,

agrupados em 13 capítulos, todos referentes à tecnologia do DNA recombinante. Enfase especial é dada à construção de vetores e ao estudo da regulação da expressão de genes clonados e inseridos em vetores. Os capítulos são redigidos num estilo típico de artigos de revisão, mas a maioria contém grande massa de dados obtida nos laboratórios dos autores. Além disso há a preocupação (louvável em todos os sentidos) de explicitar métodos de trabalho. Presumo que esta última característica deva resultar de uma decisão dos editores da série. E, desse modo, Gene amplification and analysis poderá apresentar a utilidade "de bancada" dos volumes da série Methods in enzymology (Academic Press) devotados ao DNA recombinante e manter, ao mesmo tempo, o apelo acadêmico no tratamento de áreas de fronteira.

Os capítulos iniciais do livro tratam da integração de promotores em vetores e do controle da atividade de genes clonados e transferidos para diferentes veículos de expressão. Destacam-se aqui contribuições sobre o uso de técnicas genéticas para obter-se alta expressão de proteínas "quiméricas" (operon lac de *E. coli* fundido com genes clonados, por exemplo), com especial interesse na produção de proteínas de eucariotos por sistemas bacterianos. Seguem-se um elegante estudo sobre as consequências de Shine-Dalgarno e a eficiência de tradução, trabalhos sobre a expressão de antígenos virais e oncogenes em *E. coli* e uma bem desenvolvida seção final sobre técnicas de transfecção, incluindo o uso do vírus da vaccinia como vetor.

Carlos Alberto Moreira Filho
 Deptº de Imunologia
 Instituto de Ciências Biomédicas USP
 Prédio ICB-III
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

Rozman, B. & Lopes, C., eds. - *The herpesviruses: immunobiology and prophylaxis of human herpesvirus infections*. New York, Plenum Press, vol. 4., 430p., 1985. US\$ 55.00.

Este trabalho trata dos conhecimentos sobre a patogenia, imunobiologia, profilaxia e tratamento das infecções que os herpesvírus produzem no homem. Os autores dos vários capítulos são pesquisadores em plena atividade, de forma que suas contribuições são atualizadas e grande número delas ainda em desenvolvimento.

As infecções primárias do organismo humano pelos herpesvírus (vírus do Herpes simplex, tipos I E II, da citomegalia, de Epstein-Barr e varicela-zoster) ocorrem na maioria das vezes, desde os primeiros anos de vida até a puberdade. Os herpesvírus, colonizam o organismo infectado e permanecem por toda a vida, em estado latente, não produtivo, em equilíbrio, no hospedeiro. A presente publicação descreve a variabilidade das respostas do organismo humano não só durante o primeiro contacto com estes vírus mas, também, quando há quebra do equilíbrio vírus-hospedeiro. Analisa a diversidade das reações imunobiológicas frente a grande diversificação das manifestações clínicas nos pacientes normais, nos imuno-comprometidos, nas infecções congênitas e em neoplasias como no linfoma de Burkitt, no carcinoma de rinofaringe e no carcinoma do colo uterino.

O primeiro capítulo analisa a história natural do Herpes simplex genital. Um problema em atual expansão e importante pelos efeitos sobre o relacionamento pessoal e a atividade sexual do paciente, em virtude das frequentes recidivas e da possível cronicidade. Na mulher acresce, ainda, a possibilidade de aumentar o risco da ocorrência do carcinoma do colo uterino e os problemas de transmissão ao feto e ao neonato. Revê o tratamento do Herpes simplex genital.

Os capítulos 2 e 3 tratam dos mecanismos de defesa do hospedeiro, naturais e adquiridos, relacionados com a proteção contra as infecções pelo vírus do Herpes simplex. São revistos os vários mecanismos de defesa natural mostrando a sua decisiva importância como barreiras à infecção primária e a sua ação nas recidivas. A resposta humoral à infecção herpética é estudada analisando as diversas categorias de anticorpos específicos detectados pelas várias reações imunológicas;

a imunogenicidade das diversas proteínas dos herpesvírus; o significado do aparecimento das diferentes classes de imunoglobulinas durante a infecção herpética; e procurando avaliar as características necessárias à eficácia de uma vacina, frente a estes conhecimentos. Estuda no capítulo 4, a resposta imune mediada por células-T na infecção experimental do camundongo.

O capítulo 5 descreve os danos causados pelas alterações dos mecanismos da resposta imune induzida pela presença dos herpesvírus. Analisa os fenômenos de hipersensibilidade mediados por IgE, a imunopatologia relacionada aos imuno-complexos e aquelas mediadas por linfócitos T. Descreve os últimos avanços técnicos que poderão ser utilizados no controle das reações imunopatológicas.

O capítulo 6 versa sobre a imunidade celular na citomegalia mostrando que há possibilidade de serem definidas muitas funções das células efetoras, funções estas muito importantes para a defesa do paciente também, e, que é possível modificar a resposta imune alterada em benefício do doente.

Os capítulos 7, 8 e 9 tratam do vírus de Epstein-Barr (vírus EB). O capítulo 7 descreve a imunobiologia das infecções pelo vírus EB em primatas e no homem e de outros herpesvírus linfotrópicos de primatas. O capítulo 8 versa sobre a imunidade mediada por células nas infecções pelo vírus EB e o capítulo 9 sobre a imunobiologia das neoplasias associadas ao vírus EB. Descreve como os novos conhecimentos obtidos nesta área poderão auxiliar no diagnóstico da enfermidade e nos cuidados com o paciente. Indica novas medidas potencialmente importantes no tratamento das neoplasias associadas ao vírus EB.

O capítulo 10 expõe os aspectos da infecção pelo citomegalovírus após os transplantes de órgãos. Os capítulos 11 e 12 descrevem a complexidade da resposta imune nas infecções pelo vírus EB através do estudo da imunodeficiência para o vírus EB ligada ao fator X e a defeitos do sistema interferon. Estes capítulos mostram como as infecções pelos herpesvírus podem ser gravíssimas nos indivíduos imuno-deficientes.

Os capítulos 13 e 16 estudam, com minúcias, os diversos aspectos da vacinação contra a infecção pelos herpesvírus (*Herpes simplex*, citomegalia, varicela e vírus de Epstein-Barr) campo que está em franco progresso impulsionado pelas novas conquistas da biologia molecular, imunoquímica e engenharia genética, abrindo importantes possibilidades que são criteriosamente avaliadas.

Os capítulos finais analisam os métodos de tratamento das infecções herpéticas: capítulo 17 - a quimioterapia; capítulo 18 - a interferoterapia; e capítulo 19 - os potenciadores imunológicos. Mostram que as tentativas realizadas até agora trouxeram alguns resultados positivos ao lado de muitos ensinamentos e do reconhecimento das dificuldades de avaliação das medidas terapêuticas. Demonstram, assim, que os estudos futuros deverão ser feitos com grande rigor e refinamento tanto em relação aos agentes terapêuticos como no planejamento das pesquisas.

Este volume é, portanto, rico em ensinamentos recentes e úteis, tanto para pesquisadores como para clínicos.

Renato Piza de Souza Carvalho
Prof. Titular de Virologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP

Sasazuki, T. & Tada, T., eds. - Immunogenetics: its application to clinical medicine. New York, Academic Press, 308p., 1984. US\$ 30.00.

O livro "Immunogenetics: its application to clinical medicine", editado por Takehiko Sasazuki e Tomio Tada, da Academic Press, 1984, é constituído de uma coletânea dos 28 artigos considerados mais importantes que foram apresentados na conferência comemorativa do 10º aniversário da Fundação de Pesquisa Médica Japonesa, realizada em Tóquio em 1983. Nos trabalhos preparados para este volume, são citados e discutidos os recentes conceitos e achados da imunogenética, assim como os problemas e implicações para medicina clínica, sendo portanto um livro de imunologia especializada e não um livro básico de texto.

Os artigos foram agrupados em quatro capítulos, dando ênfase, respectivamente, a Gens da resposta imune e doenças, Interações celulares e ativação na resposta imune humana, Restrições genéticas na rede e circuitos, e Genética molecular e Bioquímica

das moléculas imunologicamente importantes.

No 1º capítulo, são relatadas a existência de gens dominantes associados ao sistema HLA que determinam resposta baixa ou ausente a determinados抗igenos por indução de células T supressoras específicas, e a correlação de doenças auto-imunes com gens do complexo principal de histocompatibilidade em modelos experimentais.

No 2º capítulo, inicialmente são apresentados dados correlacionando fenótipo e função de subpopulações de linfócitos T, assim com regulação da ativação de células B por fatores derivados de hibridomas de células T. Posteriormente, são abordados o desenvolvimento e função de subpopulações de linfócitos de indivíduos apresentando um espectro de imunodeficiências caracterizadas por panhipogamaglobulinemia, a função imunoregulatória e o fenótipo de superfície de dois tipos de leucemias de células T maduras (Síndrome de Sézary e ATL-leucemia de célula T do adulto), e alguns dos mecanismos das células T que regulam a formação de anticorpos anti-receptor para acetilcolina em miastenia gravis e a formação de anticorpos anti-tireoglobulina em tiroidite crônica.

O 3º capítulo é composto de textos mais descriptivos e enfoca o envolvimento de interações idiotípicas na seleção e manutenção de um amplo repertório de receptores no sistema imune. É abordado também que algum tipo de pressão seletiva possa ter sido exercida por certos vírus sobre fatores genéticos associados à resistência imunológica e que, portanto, os抗igenos principais de histocompatibilidade estariam envolvidos no processo de reconhecimento viral.

O 4º capítulo é dedicado à contribuição do desenvolvimento e aperfeiçoamento de novas técnicas da genética molecular. A obtenção de sondas de DNA específicas para抗igenos de histocompatibilidade Classe I ou Classe II (clones de DNA complementar), tornou possível o desenvolvimento de métodos de hibridização cromossómica "in situ" que podem ser utilizados clinicamente na identificação das sequências de gens que tenham sido perdidos, ampliados ou translocados por alteração cromossómica, assim como podem fornecer informações mais detalhadas sobre as proteínas codificadas por estes gens. As inovações técnicas são relatadas com muita clareza e ilustradas com esquemas e figuras que fazem deste capítulo um dos mais importantes para o entendimento da imunogenética atual.

Nelson F. Mendes
& Zulma F. Peixinho
Escola Paulista de Medicina
Rua Botucatu, 862
04023 São Paulo SP

Veterinary immunology and immunopathology: an international journal, 5(3), Jan. 1984. 12 números/ano US\$ 162.00.

Esta revista veio preencher uma lacuna existente na área de imunologia que é destinada à imunologia veterinária.

Os estudos de imunologia veterinária e a imunopatologia ganharam ênfase nos últimos anos, chegando hoje ao ponto de constituir uma disciplina com seus interesses próprios. Assim sendo a existência deste periódico é uma consequência do estado atual da arte.

Constituem assuntos de interesse para publicação: 1. pesquisa dos sistemas imunes de animais (aspectos básicos); 2. imunoquímica, tumores, transplantes; 3. técnicas e desenvolvimento em imunodiagnóstico veterinário; 4. imunologia clínica, imunologia e imunopatologia de doenças infecciosas e parasitárias.

Esta revista devido ao enfoque imunológico e comparativo é tão abrangente que constitui consulta obrigatória não só aos pesquisadores da área veterinária, como também aos interessados em imunologia médica e em imunopatologia.

Thereza L. Kipnis
Deptº de Imunologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Prédio ICB-III
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

PRODUÇÃO DE BIOGÁS A PARTIR DE RESÍDUOS ORGÂNICOS

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

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

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

A EXPERIÊNCIA DA IMPLANTAÇÃO DE BIODIGESTORES RURAIS NO BRASIL

Normando Alves da Silva

EMBRATER

SEP/Norte W3, Q.515, Lote 03
70770 Brasília DF

O objetivo geral do projeto de difusão de biogás, da EMBRATER, é de incrementar o consumo energético nas áreas rurais, mediante a difusão do uso de biodigestores, visando a melhorar a qualidade de vida das populações rurais e assim contribuir para a fixação do homem no meio rural.

São objetivos específicos desse projeto

- a. Promover a difusão e a instalação de biodigestores a nível de produtor rural no país;
- b. Oferecer aos produtores rurais uma nova energia alternativa de baixo custo, capaz de substituir o combustível de petróleo para motores de ciclo Otto e Diesel;
- c. Fortalecer a economia doméstica dos produtores rurais, substituindo a lenha, o carvão, o querosene e o gás GLP de petróleo, pela combustão do biogás;
- d. Assegurar aos produtores rurais a utilização nas culturas de um biofertilizante rico e assimilável;
- e. Despoluir o meio ambiente através da reciclagem dos dejetos animais e humanos no biodigestor;
- f. Fornecer um efluente despoluído, rico em nutrientes, para alimentar animais e peixes.

Justificativa do projeto

O biogás é uma opção energética promissora, dentro da área da biomassa que pode ser utilizada em todas as empresas agrícolas, mesmo havendo disponibilidade de eletrificação rural.

Teoricamente o biodigestor é viável para todas as empresas rurais, mesmo que não disponham de dejetos animais.

Atualmente o biodigestor é considerado uma peça indispensável para o desenvolvimento de uma agricultura moderna e biodinâmica.

O biodigestor produz o combustível e o biofertilizante. Em decorrência, recicla os resíduos orgânicos das culturas e dos dejetos animais, controla a poluição do meio ambiente, melhora a fertilidade do solo, aumenta a produção agrícola, melhora as condições de higiene e saúde da família rural, dos animais e das plantas, concorre para a alimentação dos animais e dos peixes, reduz a mão-de-obra nos

trabalhos da sementeira, de carpina e dos trabalhos domésticos, proporciona mais lazer para a família contribuindo para a fixação do homem no meio rural.

A adoção dos biodigestores pelos produtores está diretamente vinculada com a simplicidade desta nova tecnologia.

A experiência brasileira tem demonstrado que os produtos do biodigestor, o biogás e o biofertilizante, vão de encontro aos objetivos dos empresários agrícolas, resultando uma adição crescente desta tecnologia simples e de baixo custo.

Assim, o Projeto de Difusão de Biogás está provocando uma ampla conscientização dos produtores rurais sobre o uso racional de resíduos orgânicos, antes são utilizados ou relegados a um segundo plano na propriedade rural.

Os próprios técnicos da extensão rural estão desenvolvendo atividades de substituição de fertilizantes químicos pelo biofertilizante, resultante da biodigestão.

A disponibilidade de matéria orgânica nas propriedades rurais é grande e pode ser reciclada pelo biodigestor, gerando um enorme potencial energético, capaz de substituir parte dos combustíveis derivados do petróleo.

Neste contexto, o Projeto de difusão de biodigestores no meio rural, foi coordenado pela EMBRATER no período de 1980/81, em 25 associadas, tendo alocado recursos financeiros oriundos do Convênio MME/MA em 1980, da ordem de 42 milhões de cruzeiros e mais 40 milhões do PME em 1981.

Nível tecnológico atual

No período de 1980/82, o Projeto de difusão de biodigestores, em processo de implantação no sistema de extensão rural em 25 Estados, procurou definição de tecnologia mais apropriada para as condições do meio rural brasileiro, redefiniu metas e diretrizes e procurou reduzir a relação custo/benefício dos biodigestores, buscando soluções mais compatíveis com a nossa realidade rural.

Neste período, a criatividade dos nossos técnicos foi fator positivo para encontrar soluções dos problemas que apresentaram os modelos clássicos de biodigestores (chinês e indiano) dentro da nossa realidade rural.

Atualmente, na maioria dos Estados, os técnicos já dominam a tecnologia de construção e implantação de biodigestores. Persistem, todavia, os problemas de manejo dos biodigestores e do biofertilizante pelos produtores e técnicos. É necessário tempo para que os produtores incorporem e dominem a tecnologia, com a ajuda dos técnicos da extensão rural.

Na ausência de resultados de pesquisa, os extensionistas estão instalando unidades de observação, para dispor de elementos técnicos sobre o uso diversificado do biofertilizante nas diversas culturas como fator de adubação orgânica rica e despoluidor do meio ambiente.

Com relação ao tipo de biodigestor mais procurado pelos produtores, o modelo de cúpula fixa está se revelando de maior aceitação entre os modelos conhecidos, por ser de baixo custo, de fácil manejo, tempo de vida útil e não utilização de material nobre na construção.

Novas tecnologias de biodigestores e novos processos de biodigestão precisam ser incorporados constantemente através de capacitação e reciclagem dos extensionistas que estão transferindo estas tecnologias para os produtores rurais.

Por sua vez, a indústria privada de equipamentos e motores a biogás, continuará a ser estimulada e apoiada para que participe do processo de desenvolvimento destes produtos que serão absorvidos pelos usuários do biogás.

Alguns resultados alcançados de 1980 a 1982

- a. No período de 1980 a 1981 o Projeto instalou 1982 biodigestores a nível de propriedade rural e 280 Unidades Demonstrativas que são pólos de difusão da tecnologia de biodigestores no meio rural. Neste mesmo período estavam em construção mais 468 biodigestores.
- b. No mesmo período de 1980/81 as associadas capacitaram 2983 técnicos

extensionistas em tecnologia de biogás, através de 149 cursos para difundir diretamente aos produtores rurais a tecnologia do biogás, realizando 281 dias-de-campo com frequência superior a 37900 produtores rurais.

c. Em 1980/82 os extensionistas realizaram 563 excursões para 15322 produtores e 1899 reuniões para 31976 produtores interessados em biogás, além de programas de rádio (910) e de TV (85).

d. Milhares de cartazes (78400) e folders (630000) alusivos ao biogás estão disseminando a nova tecnologia no meio rural brasileiro.

e. No período de 1980/82 foram impressas e distribuídas no meio rural 21200 cartas circulares e realizadas 142 exposições sobre biogás, com a presença de milhares de produtores.

f. Os bancos privados e oficiais realizaram em 1980/82 através dos extensionistas, 820 empréstimos para instalação de biodigestores no valor de Cr\$ 219.472.000,00.

g. A indústria privada está construindo equipamentos e motores exclusivamente a biogás, colaborando no Projeto Embrater/MA para atender a demanda dos produtores rurais e exportando estes bens para a América Latina.

h. A EMBRATER está coordenando a Rede Latinoamericana de Biogás e Reciclagem Orgânica por delegação da FAO e de 14 países que reunidos em mesa redonda em junho/81, em Brasília, constituindo a Rede de Biogás para estimular a cooperação horizontal entre instituições da América Latina.