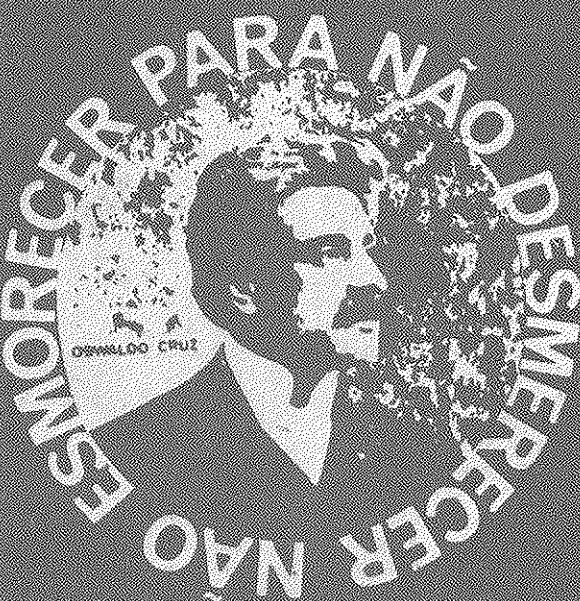


Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 17 Número 4 Out.-Dez. 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 nano (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($m\mu$) micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6}m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9}m$), ao invés de milímicro ($m\mu$); e Angstroms (\AA ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro/litro$). A Revisão se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem e 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 alfabetica de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas seqüencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas e minúsculas, títulos do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

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

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

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:
Miller, S. E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

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

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabecalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na 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 reticulados devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob TABELAS. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

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

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

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

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil



Conselho Diretor	Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo
Diretor Executivo	João Salvador Furtado Instituto de 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.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente Marcelo Magalhães Universidade Federal de Pernambuco Cidade Universitária 50000 Recife PE	Vice-Presidente João Salvador Furtado Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo
	Secretário Geral Milton de Uzeda Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 21941 Rio de Janeiro RJ	Tesoureiro Walderez Gambale Instituto de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 Cidade Universitária USP 05508 São Paulo SP
Objetivos	A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agrupar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.	

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

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.

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 17 OUTUBRO-DEZEMBRO 1986 NÚMERO 4
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 17(4)

	CONTEÚDO	CONTENTS
Khadikar, P.V.; Pol, B. & Ali, S.M.	291 Estudos das relações entre estrutura e atividade: correlação da atividade antimicrobiana com as constantes de protonação	Studies on structure activity relationships: correlation of antimicrobial activity with protonation constants
Farias, L. de M.; Carvalho, M.A.R. de; Damasceno, C.A.V.; Cisalpino, E.O. & Costa, J.E. da	296 Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> isolados de lesões periodontais humanas	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> from human periodontal lesions: morphological, biochemical and physiological characterization
Bermudez, L.E.M.	307 Aderência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a macrófagos: possível papel na fagocitose de microrganismos em pacientes neutropênicos	Adherence of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to macrophages: possible role in the phagocytosis of microorganisms in neutropenic patients
Hirooka, E.Y. & Salzberg, S.P.C. de	313 Efeito do íon magnésio no desenvolvimento e produção de proteínas extracelulares na linhagem de <i>Staphylococcus aureus</i> S-6	Effect of the ion magnesium on the development and extracellular proteins production of strain <i>Staphylococcus aureus</i> S-6
Prieto, G.; Marín, C. de; Martínez, A. & Leal, E.	321 Infección urinaria por <i>Haemophilus influenzae</i>	Urinary infection by <i>Haemophilus influenzae</i>
Hofer, E. & Silva, C.H.D.	327 Caracterização sorológica de amostras de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isoladas de peixes capturados no litoral brasileiro	Serological characterization of strains of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> isolated from fishes caught off the Brazilian coast
Rodrigues, D. dos P. & Hofer, E.	332 Caracterização de espécies do gênero <i>Vibrio</i> do ecossistema água-ostra da Baía de Sepetiba, RJ, Brasil	<i>Vibrio</i> species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil

Yano, T.; Tamashiro, W.M. da S.C.; Garcia, M. & Castro, A.F.P. de	339	Detecção de Vero citotoxina (VT) em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros com diarréia	<i>Detection of Vero cytotoxin (VT) among strains of <i>Escherichia coli</i> isolated from calves with diarrhea</i>
Giorgi, W.; Genovez, M.E.; Scarcelli, E. & Picone, A.B.B.	342	Infertilidade e abortamentos em rebanho bovino causados por <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i> : profilaxia e tratamento	<i>Infertility and abortions in cattle due to <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>: control procedures and treatment</i>
Ogassawara, S.; Benassi, S.; Larsson, C.E. & Hagiwara, M.K.	346	<i>Cryptosporidium curyi</i> sp.n. nas fezes de gatos na cidade de São Paulo, Brasil	<i>Cryptosporidium curyi sp.n. in the feces of cats in the city of São Paulo, Brazil</i>
Araújo, M.L.C. de; Ito, I.Y.; Santiago, M.E.B.; Cardoso, M.S. & Cunha, E.C. da	350	<i>Staphylococcus aureus</i> : pesquisa de portadores bovinos em lactação e antibiograma das cepas isoladas	<i>Staphylococcus aureus: search of bovine hosts during milking period and antibiogram of isolated strains</i>
Souza, T.L. de & Tórtora, J.C. de O.	356	<i>Clostridium perfringens</i> enterotoxigenico em carne moída bovina no Rio de Janeiro	<i>Enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> in cattle ground meat in Rio de Janeiro</i>
Diez, A.M.F.; Abrahão Neto, J. & Cunha, B.C. de A.	364	Ocorrência de ácido oxálico na biossíntese de penicilina	<i>Oxalic acid in penicillin industrial fermentation</i>
Morais, S.M.F. de; Aquarone, E.; Rose, A.H. & Beavan, M.J.	371	Efeito do etanol na atividade fermentativa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Ethanol effect on fermentative activity from <i>Saccharomyces cerevisiae</i></i>
Sérvulo, E.F.C. & França, F.P. de	376	Fermentação alcoólica de caldo de cana-de-açúcar por <i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Alcoholic fermentation from sugar cane juice by <i>Zymomonas mobilis</i></i>
Informação Técnico-Científica SBM	385		

STUDIES ON STRUCTURE ACTIVITY RELATIONSHIPS: CORRELATION OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY WITH PROTONATION CONSTANTS

Padmakar V. Khadikar

Bhagyashree Pol

& Syed Mushtaq Ali

Department of Chemistry

D.A.V.V. Vygyan Bhawan, Khandwa Road

Indore 452001

India

Summary

The correlation of antimicrobial activity of salicylic acids with their protonation constants shows that activity of salicylic (SA^-), 4-aminosalicylic ($4ASA^-$), 5-sulphosalicylic ($5SSA^-$) and 3,5-dinitrosalicylic ($3,5DNSA^-$) acids is found to be in the order: $5SSA^- > SA^- > 4ASA^- > 3,5DNSA^-$, which is the order of protonation of phenolate oxygen. The maximum antimicrobial activity is attributed to the presence of $-\text{NH}_2$ and $-\text{SO}_3\text{H}$ groups in the salicylate moiety.

Resumo

Estudos das relações entre estrutura e atividade: correlação da atividade antimicrobiana com as constantes de protonação

A correlação da atividade antimicrobiana dos ácidos salicíticos com as constantes de protonação mostra que a atividade do salicílico (SA^-), 4-amino salicílico ($4ASA^-$), 5 sulfo salicílico ($5SSA^-$) e 3,5,dinitro salicílico ($3,5DNSA^-$) é encontrada na sequência: $5SSA^- > SA^- > 4ASA^- > 3,5DNSA^-$, que é ordem de protonação do oxigênio no fenolato. A máxima atividade antimicrobiana é atribuída a presença de radicais $-\text{NH}_2$ e $-\text{SO}_3\text{H}$ no núcleo do salicilato.

Introduction

Salicylic acid and its derivatives have been widely used in medicinal chemistry (10, 11). Recently, we have reported (3,6) the antimicrobial activity of metal chelates of salicylic (SA^-), 3:5 dinitrosalicylic ($3,5DNSA^-$), 4-aminosalicylic ($4ASA^-$), 5-sulphosalicylic ($5SSA^-$) acids and their mixed ligand complexes (2, 4). The results have shown that chelation enhances the activity in each case. In an attempt to correlate antimicrobial activity with bonding parameters of metal chelates it was thought worthy to investigate the correlation of activity with protonation constants of salicylic acid as they are responsible for the formation of metal chelates.

The formation of metal chelates and therefore their antimicrobial activity, generally, depends upon the presence and position of different groups in the organic moiety acting as a ligand. In salicylic acids it is reflected by their protonation constants. In view of this the present communication deals with the antifungal and antibacterial activity of SA, $5SSA^-$, $4ASA^-$ and $3,5DNSA^-$, so as to observe the effect of protonation constants on the antimicrobial activity.

Material and Methods

Chemicals - All chemicals used were of B.D.H. Analar or equivalent grade. The salicylic acids as mentioned above were used as supplied.

pH-measurements - The pH-measurements were made employing Cambridge bench-type pH-meter with an accuracy of ± 0.001 pH unit.

Fungicidal screening - Salicylic acids as listed were screened for their antifungal activity in vitro by agar growth technique (1) against five fungi as listed in Table 1. The test solutions of 1% concentration were prepared in dimethyl formamide (DMF). Sabouraud's agar media was used for culturing the organism. The melted media was aseptically poured into petri-dishes and then 2.0ml of inocula was added to the dish.

The inocula of the tested organism were prepared on the agar nutrient medium at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ for twenty four hours incubation. The 2mm disc of inocula dissolved in 2ml of previously sterilized water in aseptic condition to avoid contamination were used for all the experiments. In case of fungi the hyphae and spores were used while in case of bacteria only spores solution was used. After setting, 4 cups of 6mm diameter were cut by sterile cork borer and filled with the test solution. These inoculated plates were incubated for 72 hours at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. The inhibitory effect was noted against the test organism by measuring the diameter of the inhibition zone around the cups.

Antibacterial screening - Filter paper disc diffusion method (10) was followed for determining antibacterial activity. Samples were dissolved in DMF to get 1% concentration. Whatman No. 1 filter paper discs of 6mm diameter were soaked in solution of respective samples and placed in nutrient agar plates surface seeded with test organisms.

The inocula standardisation was carried out as described earlier. The inhibitory effect was noted against the test organism after incubation of the plates for 24 hours at $37 \pm 1^\circ\text{C}$. The diameter of the inhibited zones were measured.

During the determination of antifungal and antibacterial activities, all the possible precautions were taken to keep the conditions of the experiments uniform, such as composition, pH, thickness of media, inoculum size, temperature, time of incubation, quantity and concentration of drug solution and the criterion used to measure activity.

The presence of a definite zone of inhibition of any size surrounding the paper discs indicated antimicrobial activity. The zones of inhibitions were measured to the nearest mm by means of a metric meter and an illuminated Quebec colony counter. All tests were conducted in triplicate with three discs per dish. Therefore the measurements of each zone of inhibition represents the mean value of at least six recordings. The mean values are recorded in Table 2.

The statistical analysis of the data employing student t-test indicated experiment significant at 5% level.

Protonation constants - Bjerrums pH-titration technique as described by Khadikar and Deshmukh (3) was used for the estimation of protonation constants under the experimental conditions used for studying the antimicrobial activity. The results are given in Table 1.

Results and Discussion

During the determination of antifungal and antibacterial activities all possible precautions were taken to keep the conditions of the experiments uniform regarding thickness of media, inoculum, time of incubation and the quantity of test solutions used.

Protonation constants - The protonation constants and the results obtained for the

Table 1 - Protonation constants for salicylic acids ($30 \pm 10^{\circ}\text{C}$)^a

Symbols: a. = $\log K_1^{\text{H}}$ = Protonation constant for phenolate oxygen; $\log K_2^{\text{H}}$ = Protonation constant for carboxylate anion; $\log K_3^{\text{H}}$ = Protonation constant for protonation of $-\text{NH}_2/-\text{SO}_3\text{H}$ group; $\log \beta_3^{\text{H}}$ = Overall protonation constant; $\log \beta_2^{\text{H}}$ = Overall protonation constant for protonation of phenolate and carboxyl oxygen; * = Protonation constant for protonation of $-\text{NH}_2$ group; ** = Protonation constant for protonation of $-\text{SO}_3\text{H}$ group

Acid	$\log K_1^{\text{H}}$	$\log K_2^{\text{H}}$	$\log K_3^{\text{H}}$	$\log \beta_3^{\text{H}}$	$\log \beta_2^{\text{H}}$
SA	11.90	3.20	-	15.10	15.10
5-ASA	11.20	5.95*	2.79	19.76	13.99
5-SSA	12.20	3.08	1.95**	17.23	15.28
3,5-DNSA	8.17	2.03	-	10.20	10.20

antimicrobial screening of salicylic acids are given in Tables 1 and 2 respectively. The persual of Table 1 shows that the protonation of phenolic oxygen of salicylic acid ($\log K_1^{\text{H}}$) moiety follows the order: 5-SSA > SA > 4ASA > 3,5-DNSA.

Table 2 - Antifungal and antibacterial activity of salicylic acids^b.

Symbols: b. = Including the diameter of disc (6mm); ++ = Dimethyl formamide (DMF) not showing activity; - = Not showing activity. The statistical analysis of the data employing student t-test indicated experiment significant at 5% level

	Mean diameter (mm) of inhibited zones**			
	SA	4-ASA	5-SSA	3,5-DNSA
Fungi				
Cunninghamella sp.	-	-	-	-
Rhizopus nigricans	15	14	16	16
Penicillium chrysogenum	-	12	14	14
Aspergillus niger	-	14	10	-
Mucor species	12	12	14	14
Bacteria				
Proteus vulgaris	8	10	-	8
Pseudomonas aeruginosa	9	8	11	-
Bacillus subtilis	7	17	13	14
Escherichia coli	7	-	-	-
Salmonella typhi	-	15	-	13
Staphylococcus aureus	-	9	-	10

The corresponding values for the protonation of carboxyl oxygen ($\log K_2^{\text{H}}$) follows the sequence: SA > 5-SSA > 4-ASA > 3,5-DNSA.

The order of overall protonation ($\log \beta_3^{\text{H}}$) being: 4-ASA > 5-ASA > SA > 3,5-DNSA.

If we do not consider the protonation of -NH_2 (4-ASA) and $\text{-SO}_3\text{H}$ (5SSA) groups which do not participate in chelation with metal ions, the overall protonation ($\log \beta_2^{\text{H}}$) then follows the order: 5-SSA > SA > 4-ASA > 3,5-DNSA.

Antifungal activity - The results reported in Table 2 indicates that, except for *Cunninghamella* sp., all the salicylic acids screened exhibit antifungal activity. However, the acids differ in their fungicidal nature, which may be attributed to the presence and position of different groups in the salicylic acid moiety and therefore to the corresponding protonation constants.

In general the antifungal activity of substituted salicylic acids is found to be more compared with the parent salicylic acid. Further more, 5-SSA exhibited maximum antifungal activity. It is noteworthy that 3,5-DNSA exhibit identical behaviour against all the fungi used.

Antibacterial activity - All the salicylic acids are found to be active against the bacteria used, except *E. coli* against which salicylic acid alone is found to be active.

The perusal of Table 2 shows that 4-ASA exhibits pronounced antibacterial activity against all the bacteria. The antibacterial activity of 4-ASA, 5-SSA and 3,5-DNSA against *B. subtilis* is found to be about two to three times greater than the parent salicylic acid.

Correlation of the activity with protonation constants - The comparison of results presented in Table 2 with the protonation constants given in Table 1 indicates that, in general, the inhibition of fungal growth increases gradually with increase in the overall protonation constants ($\log \beta_2^{\text{H}}$) of salicylic acid and also protonation of phenolate oxygen. The inhibition sequence being: 5-SSA > SA > 4-ASA > 3,5-DNSA.

This indicates that protonation of phenolate oxygen is probably responsible for the antifungal activity exhibited by salicylic acids.

No definite trend between antibacterial activity and protonation constants could be observed. However, in case of *B. subtilis*, antibacterial activity follows the order: 4-ASA > 3,5-DNSA > 5-SSA > SA.

Conclusion

The results have shown that the protonation of phenolate oxygen is responsible for the exhibition of antimicrobial activity of salicylic acids. Further, the presence of -NH_2 and $\text{-SO}_3\text{H}$ groups are probably responsible for maximum antifungal activity while -NH_2 group is responsible for the enhanced antibacterial activity of salicylic acid moieties.

References

1. Smith, M.S.R. & Smith, P. - The salicylates: a critical bibliographic review. Interscience (New York), 25:35, 1966.
2. Zolksi, S. - Chemistry of drugs. Warsaw, 1964.
3. Khadikar, P.V.; Kaskhedikar, S.G. & Heda, B.D. - Metal complexes of 5-sulphosalicylic acid and their antimicrobial activity. Indian J. Pharm. Sci., 46:209-211, 1984.
4. Khadikar, P.V. & Heda, B.D. - Antifungal and antibacterial activities of Co(II) chelates of salicylic and substituted salicylic acids. Indian J. Pharm. Sci., 42:174-175, 1980.
5. Khadikar, P.V., Kaskhedikar, S.G. & Heda, B.D. - Transition metal complexes of 3,5 dinitrosalicylic acid: antimicrobial activity. Indian J. Hospit. Pharm., 17:1-5, 1980.
6. Khadikar, P.V.; Pol, B. & Heda, B.D. - Antimicrobial activity of metal chelates of salicylic acid. Indian J. Microbiol., 21:331-334, 1981.

7. Khadikar, P.V., Mishra, S.M. & Saxena, C.P. - Antibacterial activity of some mixed ligand complexes of Cu(II), Ni(II), Co(II) and Fe(II). Indian J. Hospit. Pharm., 15:1-4, 1978.
8. Khadikar, P.V. & Saxena, C.P. - Studies on the antifungal activity of some mixed ligand metallic complexes of salicylic acid. Curr. Sci., 48:20-22, 1979.
9. Khadikar, P.V.; Das, A.K. & Deshmukh, P.S. - Formation constants and thermodynamic parameters of some poly-hydroxy phenols. Curr. Sci., 47:672-674, 1978.
10. Horsfall, J.C. - Quantitative bioassay of fungicides in the laboratory. Bot. Rev., 11:357-397, 1945.
11. Maruzzella, J.C.K. & Henry, P.A. - The antibacterial activity of perfume oils. J. Am. Pharm. Assoc., 47:471-476, 1958.

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, BIOQUÍMICA E FISIOLÓGICA DE ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS ISOLADOS DE LESÕES PERIODONTAIS HUMANAS*

Luiz de Macêdo Farias (Bolsista CAPES)

Centro de Ciências da Saúde FUFPI
Deptº de Medicina Comunitária
Av. Frei Serafim, 2280
64000 Teresina PI, Brasil

Maria Auxiliadora Roque de Carvalho
Carlos Américo Veiga Damasceno
Eduardo Osório Cisalpino

Instituto de Ciências Biológicas UFMG
Deptº de Microbiologia
Caixa Postal 2486
30161 Belo Horizonte MG, Brasil

& José Eustáquio da Costa

Faculdade de Odontologia UFMG
Rua Conde de Linhares, 141
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

Foram isoladas e caracterizadas 14 amostras de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, de lesões periodontais humanas, de 30 pacientes da Clínica de Periodontia da FO/UFMG. As amostras foram isoladas em meio seletivo (TSBV), em anaerobiose e microaerofilia, e estudadas com relação às características morfológicas (coloniais e celulares), bioquímicas e fisiológicas, alguns aspectos de conservação de culturas e seu comportamento quanto a inibidores químicos e corantes. Todas as amostras isoladas apresentaram as características morfológicas (coloniais e celulares), bioquímicas e fisiológicas típicas da espécie. Todas cresceram em microaerofilia, as temperaturas ambiente (23-25°C), 28°C e 37°C, sendo inibidas a 45°C. Todas permaneceram viáveis, em cultura, até 72 horas à atmosfera ambiente; em anaerobiose e microaerofilia, a 37°C e, em condições atmosféricas a 4°C, até 15 dias. A caracterização bioquímica e fisiológica reforça os dados da literatura quanto à heterogeneidade do grupo *A. actinomycetemcomitans*, indicando um provável desdobramento taxonômico.

Summary

Actinobacillus actinomycetemcomitans from human periodontal lesions: morphological, biochemical and physiological characterization

14 strains of *A. actinomycetemcomitans* were isolated from 30 human periodontic specimen. Strains were characterized by morpholo-

*Auxílio parcial CNPq (Processo nº 406022/85).

gical, physiological and biochemical features. All isolates presented typical cellular, colonial, physiological and biochemical characteristics as described in the 8th Bergey's Manual and in Slots (27). Cultured in microaerophilic conditions, all strains grew up at 28°C and 37°C and were inhibited at 45°C. None of them resisted to 60°C for 30 minutes. The strains kept viable until 15 days, in culture, under anaerobic and microaerophilic conditions, at 37°C and at 4°C under atmospheric conditions. This study as other previously described confirm the relative heterogeneity of the *A. actinomycetemcomitans* group and the necessity to stabilize the taxonomic relationship of this organism.

Introdução

A hipótese da ocorrência de placas específicas, com maior potencial cariogênico ou periodontal e a consequente necessidade do aprofundamento dos estudos para se avaliar os possíveis papéis dos diversos microrganismos com reconhecimento potencial patogênico, tendo em vista a complexidade da flora oral, gerou uma verdadeira corrida em busca de dados bacteriológicos que pudessem orientar de forma mais objetiva o diagnóstico e tratamento das doenças orais.

Durante algumas décadas, após sua descrição original por Klinger (13), *A. actinomycetemcomitans* foi mencionado na literatura como usualmente associado a lesões actinomicóticas, fato que suscitou seu nome distintivo, dada sua reconhecida associação com *Actinomyces israelii* (5, 9).

Antes dos relatos de King & Tatum (12), em 1962, somente Thjotta & Sydnes (32) e Valeé & Gilliard (34) haviam descrito o isolamento de *A. actinomycetemcomitans* em infecções não relacionadas à actinomicose. Na década de setenta *A. actinomycetemcomitans* passou a ser isolado de diversos tipos de doenças periodontais (24, 25), sugerindo Irving & col. (11) que poderia servir como provável indicador do processo, após demonstrar a reprodução experimental da doença, inoculando em ratos isentos de germes o microrganismo isolado de periodontite juvenil humana.

A. actinomycetemcomitans apresenta uma série de componentes citotóxicos e pode elaborar inúmeros produtos que podem contribuir para destruição de tecidos periodontais, destacando-se uma potente endotoxina, uma colagenase, um fator citotóxico para leucócitos polimorfonucleares e monócitos humanos (leucotoxina), uma toxina indutora de reabsorção óssea e um ativador de células policlonais "B" (3, 15, 29, 33).

A literatura nacional não faz referência ao isolamento de *A. actinomycetemcomitans* como flora normal ou possível agente etiológico de infecções, sejam mistas ou monomicrobianas, quer da cavidade oral ou quaisquer outras regiões do corpo. Do ponto de vista bacteriológico, a experiência nacional, com relação ao isolamento e caracterização de *A. actinomycetemcomitans*, cuja localização taxonômica é ainda bastante frágil, é escassa ou, praticamente nula.

Desta forma, considerando-se, mesmo sem dados estatísticos mais profundos, a reconhecida alta prevalência desta infecção no país, cuja população predominante é de indivíduos jovens e carentes sob todos os aspectos; e considerando-se a necessidade de se desenvolver uma experiência nacional, do ponto de vista microbiológico, que possa dar o devido suporte científico à clínica, o presente trabalho teve como objetivos: a) aprimorar a metodologia de estudos de germes anaeróbios, levando em consideração a variável sensibilidade ao oxigênio, e implantar uma rotina para isolamento e caracterização de *A. actinomycetemcomitans* que possa ser utilizada em nosso meio, não só para esse microrganismo mas também para outros anaeróbios mais exigentes e sensíveis, de importância na patologia humana e animal, gerando, com isso, a formação de recursos humanos; b) Contribuir para o conhecimento de *A. actinomycetemcomitans*, pouco estudado em nosso meio, isolando e caracterizando amostras de lesões periodontais humanas.

Material e Métodos

O material utilizado foi coletado de pacientes selecionados por apresentarem sitios com lesões periodontais clinicamente evidentes, com bolsas variando em média de sete a dez milímetros de profundidade, num total de 30 indivíduos, na faixa etária de 14 a 50 anos, sendo 12 entre 14-25 e 18 entre 28-50 anos. Esses pacientes foram admitidos na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UFMG para tratamento de doença periodontal avançada em molares e incisivos (periodontite juvenil localizada), doença periodontal progressiva generalizada em jovens (periodontite juvenil generalizada) e periodontite de adulto.

Os espécimes foram coletados utilizando-se cones de papel absorvente estéreis, que permaneceram por dois segundos no interior da bolsa, sendo transferidos, sob fluxo de CO₂, para 2,5ml de solução de Ringer pré-reduzida (PRAS), pH 7,2, na qual eram transferidos ao laboratório para posterior processamento, com intervalo máximo de duas horas (28). O espécime era submetido à agitação em vórtex por 60 segundos, para dispersá-lo do cone de papel. Em seguida todos os procedimentos incluindo as diluições, plaqueamento e incubação nas diferentes atmosferas foram processados segundo Slots (28), utilizando-se o meio seletivo (TSBV) como proposto, cuja eficiência foi provada e controlada pelo cultivo das amostras de referência 29.522, 29.523, 29.524 (ATCC) e 9709 e 9710 (NCTC), fornecidas pelo professor Jorgen Slots (Dep. Oral Biology and Periodontal Diseases, Clinical Research Center, N.Y. Buffalo, USA).

Após três dias de incubação observaram-se as colônias características com lupa esterioscópica, conforme descrito para *A. actinomycetemcomitans* (28), utilizando-se como padrão as amostras de referência. Das colônias suspeitas faziam-se repiques para "Brain Heart Infusion Broth" (BHI-PRAS), incubando-se a 37°C por 48 horas, transferindo-se então uma gota de cada cultura para 5ml de solução de Ringer (PRAS), realizando-se diluições seriadas e transferindo-se aliquotas de 0,1ml das diluições 10⁻⁵ a 10⁻⁷ para placas do meio seletivo, incubando-se como citado. Após 48 horas observavam-se as colônias crescidas nas diferentes atmosferas, e realizava-se o teste de catalase e coloração de Gram.

Das colônias características procedia-se o repique para "Tryptic Soy Agar" (TB) suplementado (28), para posterior caracterização bioquímico-fisiológica, incluindo-se ação de alguns inibidores químicos e corantes, de fatores abióticos e conservação de culturas, utilizando-se meios e procedimentos segundo Cowan (9), Carvalho (4) e Slots (27). O estudo das características celulares e de crescimento em meio líquido foi realizado em BHI-pré-reduzido (PRAS). Após controle de pureza, as amostras eram preservadas em meio "TB" e liofilizadas.

Resultados e Discussão

O emprego de meio seletivo TSBV (28), pela adição de bacitracina e vancomicina, nas concentrações de 75µg/ml e 5µg/ml, respectivamente, permitiu suprimir a maioria das espécies orais, levando a um isolamento significativamente alto de *A. actinomycetemcomitans*, em comparação com outros meios tão eficazmente seletivos. Esse meio supera, ainda, vários problemas de cultivo de microrganismo, uma vez que o enriquecimento com soro de cavalo, em vez de sangue, garante seu isolamento, mas suprime o crescimento de *Haemophilus*, requerente de fator hemina, permitindo ainda a aplicação direta de água oxigenada no isolamento primário para a caracterização presuntiva de *A. actinomycetemcomitans*.

Seguramente a eficiência de isolamento alcançada se deve também à técnica de coleta dos espécimes, usando-se cones de papel absorvente estéreis, uma vez que o microrganismo pode estar localizado junto à superfície epitelial contigua à placa subgingival (1) e no tecido conjuntivo gengival (23).

Seria importante ressaltar a eficiência das condições de anaerobiose para o isolamento primário do microrganismo, possivelmente relacionado com suas condições ecológicas "in vivo", garantindo maior seletividade e mostrando um crescimento com morfologia colonial mais típica.

Verificou-se, pelos resultados obtidos com as amostras isoladas, um comportamento

relativamente homogêneo, tanto no que se refere às características morfológicas, coloniais e celulares, quanto em relação ao comportamento bioquímico, ocorrendo pequenas variações, de acordo com a literatura, e que serão discutidos a seguir, correspondendo "in totum" ao observado com as amostras de referência.

Observou-se a morfologia colonial típica, descrita para todas as amostras isoladas. O tamanho colonial variou, em média, de 0,5 - 1,0mm de diâmetro, quando sob incubação por 72 horas em meio sólido. Entretanto, incubação mais prolongada resultava em aumento de diâmetro até 3,0mm, fenômeno já observado (14, 32).

Na maioria dos isolamentos primários, as colônias apresentavam-se viscosas, com forte aderência à superfície do meio sólido, deixando pequenas escavações, visíveis quando destacadas e perdendo a aderência por repiques sucessivos (5, 14, 27, 28, 30), o que poderia estar relacionado à perda de estrutura capsular.

Em meio líquido todas as amostras isoladas cresciam em flóculos, sem turvar o meio, com tendência a se aderir às paredes do tubo e a se formar leve sedimento pegajoso, confirmando dados da literatura (7, 14, 32).

As amostras apresentaram características celulares típicas, isto é, mostrando acentuado pleomorfismo, desde cocos a cocobacilos muito pequenos (meio sólido), até bastonetes maiores e mesmo formas filamentosas, em meio líquido, dispondo-se as formas bacilares em pequenas cadeias, como pequenos aglomerados dispostos irregularmente, e em formas encurvadas (5, 7, 10, 28, 30). O microrganismo tem sido descrito "in vivo" na forma de cocos delgados, agrupados ou não (5, 13, 34).

Embora descrito por alguns como não capsulado (18), testando-se vários métodos para detecção de cápsula, conseguiu-se evidenciar essa estrutura pelo método de Hiss, confirmando-se outros achados (10). Esse envoltório, composto de carboidratos, determinaria os sorotipos de *A. actinomycetemcomitans*, já caracterizados como a, b e c (36), sugerindo-se um papel ecológico e importância na patogênese para os sorotipos a e b, em termos de habilidade de colonização, de ataque aos tecidos orais e de invasão dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Considerando-se a heterogeneidade do grupo hoje denominado *A. actinomycetemcomitans* e a importância da estrutura capsular na patogênese, serão essenciais estudos com grande número de amostras e de diversas procedências, como contribuição de caráter taxonômico para o esclarecimento do seu papel na colonização e virulência desses microrganismos.

Pulverer & Ko (21) agruparam as amostras em biotipos, reconhecidos com base na fermentação de manitol, galactose e xilose. King & Tatum (14), estudando as características bioquímicas diferenciais de *A. actinomycetemcomitans* e de *H. aphrophilus*, demonstraram que amostras do primeiro não fermentavam a lactose e a sacarose, ao contrário do último. Da mesma forma, Slots (27) demonstrou a não fermentação de sacarose, trealose, lactose e amido por amostras de *A. actinomycetemcomitans*, diferenciando-se daquelas de *H. aphrophilus*, que fermentaram todos estes carboidratos. Já Thjotta & Sydnes (32), ao contrário, relatam a fermentação da glicose, sacarose, lactose e galactose por *A. actinomycetemcomitans*, sendo que as mesmas amostras testadas não fermentaram maltose e manitol.

Apesar do conflito da literatura quanto à fermentação de açúcares, as provas fisiológicas e bioquímicas são, em linhas gerais, relativamente constantes, o que permitiu a seleção de algumas como dados preliminares para identificação presuntiva de *A. actinomycetemcomitans* (27). Por outro lado, estes dados conflitantes na caracterização de *A. actinomycetemcomitans*, que já apresenta diferentes biotipos (21), sugerem provável alteração na sistemática do grupo, com possível distinção de espécies, como ocorreu, por exemplo, com os *Bacteroides* pigmentados (29).

As provas acrescentadas, que mostram o comportamento do germe sob diferentes temperaturas e atmosferas de cultivo, resistência à temperatura elevada, viabilidade em diferentes temperaturas, e alguns aspectos da conservação de culturas, tendo por base o trabalho de Carvalho (4), relativo a *Bacteroides melaninogenicus*, poderão contribuir para estudos taxonômicos, confirmadas com um número significativo de amostras.

A Tabela 1 indica que todas as amostras tiveram um crescimento favorecido pelo CO₂ (32); indica, ainda, que todas produziram catalase, pesquisada nas colônias típicas de bastonetes Gram negativos, considerada uma das provas essenciais para identificação de *A. actinomycetemcomitans*, ou prova para diferenciação desta

Tabela 1 - Características fisiológicas e bioquímicas de 14 amostras de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de lesão periodontal humana.

Símbolos: + = Reação positiva; - = Reação negativa; F = Fermentação; ± Reação fraca

Teste ou substrato	Amostras	
	Comportamento	Nº amostras positivas
Motilidade	-	0/14
Catalase	+	14/14
Oxidase	-	0/14
Benzidina	+	14/14
Redução de nitrato a nitrito	+	14/14
Indol	-	0/14
H ₂ S	-	0/14
Gás de glicose	±	6/14
Crescimento favorecido por CO ₂	+	14/14
Hemólise ágar-sangue carneiro	-	0/14
β-galactosidase (ONPG)	-	0/14
Hidrolise		
amido	-	0/14
gelatina	-	0/14
ureia	-	0/14
esculina	±	2/14
Oxidação-fermentação da glicose	F	14/14
Acetil metilcarbinol (VP)	-	0/14
Vermelho de metila (VM)	-	0/14

espécie de *H. aphrophilus* (14, 28).

Tanner & col. (31), estudando o comportamento de amostras de referência de *A. actinomycetemcomitans*, demonstraram que algumas decompunham a catalase, mesmo quando testadas após crescimento em meio básico com aumentada concentração de hemina, ou em meio básico com adição de hemina após autoclavagem. Relatam, ainda, que amostras usadas em seus experimentos foram estocadas em nitrogênio líquido e subcultivadas por vários meses, o que os levou a acreditar na perda da atividade catalásica ou, como mostrado por King & Tatum (14), na existência de apenas fraca atividade. Esta observação baseou-se em estudos quantitativos, mostrando que a atividade catalásica de algumas amostras de *H. influenzae* crescia com o aumento da concentração de hemina no meio. Em síntese, indicam aqueles estudos uma diversidade de respostas de diferentes amostras de *Haemophilus* quanto à atividade catalásica, com relação à concentração de hemina (2, 35).

Esta controvérsia na literatura quanto à atividade catalásica, ao lado de sua indicação como dado taxonômico preliminar na caracterização de *A. actinomycetemcomitans*, sugere a necessidade de maiores estudos no sentido de se esclarecer sobre os possíveis fatores de interferência, entre estes a hemina. A diversidade de comportamento das amostras pode estar relacionada também com suas características ecológicas, refletindo as interações microbianas, que tanto poderiam contribuir para estimular o crescimento "in vivo", como para inibi-lo, como já demonstrado com relação aos estreptococos (29). Apesar desta controvérsia na literatura, vale enfatizar o comportamento homogêneo das 14 amostras isoladas e das cinco de referência, que produziram catalase, claramente evidenciável.

Com relação às demais provas indicadas na Tabela 1, vale ressaltar a concordância praticamente integral do observado para as amostras isoladas e de referência em comparação com a literatura mais recente (22, 27, 31), conforme Tabela 4, onde se percebe alguma discordância entre autores mais antigos quanto à produção de H₂S, oxidase e redução de nitrato.

Vale ressaltar a importância da produção de β -galactosidase como mais um dado distintivo entre as espécies de *H. aphrophilus* e *A. actinomycetemcomitans*, considerados de grande proximidade taxonômica e de caracterização ainda precária, incluídos na 8^a edição do Manual de Bergey (22) num grupo de localização incerta, embora na recente sistemática (15) posto na família Pasteurellaceae. A relevância da prova se acentua quando observamos que outras espécies do próprio gênero *Actinobacillus* apresentam atividades de β -galactosidase, tornando esta prova diferencial inter-espécie do mesmo gênero, como já relatado (6, 26).

Os estudos bioquímicos referentes à fermentação de carboidratos são relativamente escassos, permanecendo alguns pontos conflitantes. Contudo, os resultados referentes tanto às amostras isoladas quanto às padrão (Tabela 2), podem ser considerados, em linhas gerais, como correspondentes aos trabalhos mais completos (Tabela 4).

Das divergências da literatura quanto às reações de fermentação ressaltam-se os resultados opostos de trabalhos mais antigos (20), com relação à utilização do amido e da galactose, comparando-os com os trabalhos mais recentes (27, 31), com os quais coincidem os resultados encontrados tanto com as amostras isoladas, quanto com as de referência utilizadas neste trabalho. É também importante mencionar a variabilidade de comportamento das amostras descritas na literatura com relação à maltose, manitol e xilose, coincidindo com os dados deste trabalho e das amostras-padrão testadas.

Valeria lembrar, ainda, o fato de que as provas de fermentação da galactose, manitol e xilose, pela variabilidade, foram utilizadas para distinção de oito diferentes biotipos dentro da espécie (21).

Finalmente, as discordâncias observadas na literatura quanto a alguns aspectos bioquímicos, particularmente a fermentação de carboidratos, como por exemplo do amido, suscitam o questionamento dos aspectos metodológicos, nem sempre descritos, seguramente não se utilizando os mesmos meios básicos, não se podendo considerar padronizados nem inóculos, nem técnicas para avaliação do abaixamento do pH, havendo possíveis variações de pureza dos substratos, e até mesmo diferenças quanto às partidas dos meios utilizados.

Os dados da Tabela 3 têm sua importância especial do ponto de vista da sistemática, lembrando-se que o microrganismo em questão é, ainda, de localização taxonômica bastante frágil. Como provas diferenciais, seriam de grande importância, considerando-se as enterobactérias como possíveis transitórias da cavidade oral. Por outro lado, algumas daquelas substâncias são potencialmente utilizáveis na composição de meios seletivos para o isolamento de bactérias orais, requerendo os dados referentes ao verde de malaquita, por exemplo, maiores estudos, já que todas as amostras foram inibidas por essa substância na concentração de 10 μ g/ml, concordando com Slots (27), substância esta proposta recentemente para compor meio

Tabela 2 - Intensidade de acidificação (I) de carboidratos e derivados, por 14 amostras de *A. actinomycetemcomitans*, isoladas de lesões periodontais humanas, em função de um controle.

Símbolos: $I \leq 0,3$ = Ausência de fermentação; $0,3 < I < 0,7$ = Fermentação fraca; $I \geq 0,7$ = Fermentação forte

Carboidratos	Nº de amostras fermentadoras		
	$I < 0,3$	$0,3 < I < 0,7$	$I \geq 0,7$
Adonitol	13	1	-
Amido	14	-	-
Arabinose	13	1	-
Cellobiose	14	-	-
Dextrina	8	2	4
Dulcitol	13	1	-
Esculina	14	-	-
Frutose	-	-	14
Galactose	13	1	-
Glicose	-	-	14
Glicerol	14	-	-
Inositol	14	-	-
Inulina	14	-	-
Lactose	14	-	-
Maltose	5	2	7
Manitol	5	2	7
Manose	-	3	11
Melibiose	14	-	-
Melítose	14	-	-
Rafinose	14	-	-
Ramnose	14	-	-
Sacarose	14	-	-
Salicina	14	-	-
Sorbitol	14	-	-
Trealose	14	-	-
Xilose	7	4	3

Tabela 3 - Susceptibilidade de 14 amostras de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de lesões periodontais humanas a substâncias químicas e corantes.

Símbolos: + = 90% ou mais cresceram dentro de 72 horas; - = 90% ou mais não cresceram dentro de 72 horas; v = 11-39% deram reação positiva; (1) = a partir do ágar telurito usou-se meio básico de Wilkins-Chalgren (1976)

Meios e agentes inibitórios	Amostras	
	Crescimento	Nº amostras positivas
Ágar de Mac Conkey (vermelho neutro, cristal violeta, sais biliares)	-	1
Ágar de Levine eosina-azul de metileno(eosina azul de metileno)	-	-
Ágar <i>Salmonella-Shigella</i> (Sais biliares, vermelho neutro, verde brilhante)	-	-
Ágar telurito (300µg/ml) ¹	-	-
Ágar cloreto de sódio (1%)	v	3
Ágar cloreto de sódio (4%)	-	-
Ágar fluoreto de sódio (10µg/ml)	v	7
Ágar fluoreto de sódio (50µg/ml)	v	3
Ágar fluoreto de sódio (100µg/ml)	-	-
Ágar cristal violeta (10µg/ml)	v	11
Ágar cristal violeta (100µg/ml)	v	3
Ágar cristal violeta (1000µg/ml)	-	-
Ágar verde bromocresol (1000µg/ml)	v	1
Ágar bile bovina (0,5%)	v	10
Ágar bile bovina (1%)	v	4
Ágar bile bovina (2%)	-	1
Ágar azul de Evans (1000µg/ml)	+	13
Ágar verde de malaquita (10µg/ml)	-	-
Ágar azul de metileno (100µg/ml)	v	3
Ágar vermelho de fenol (1000µg/ml)	+	13

seletivo (17), por não afetar *A. actinomycetemcomitans* em concentrações mais baixas.

Com relação ao fluoreto de sódio, prova pouco mencionada na literatura (27), vale mencionar a sensibilidade de *A. actinomycetemcomitans* à concentração de 100µg/ml, dado já utilizado (27) como uma das principais provas distintivas de *H. aphrophilus*, resistente até a concentrações acima de 100µg/ml.

É importante que se destaquem as sete provas sugeridas como preliminares para uma identificação presuntiva de *A. actinomycetemcomitans* (27), distinguindo-o de *H. aphrophilus*, intimamente relacionado, inclusive em termos ecológicos, e que apresenta comportamento exatamente oposto, ou seja: provas de β-galactosidase (ONPG), fermentação de amido, lactose, sacarose e trealose e de resistência ao fluoreto de sódio a 100µg/ml, positivas e catalase negativa. Vale ressaltar que diferenças metodológicas podem levar a divergências quanto às provas diferenciais, mesmo com relação aos testes propostos como preliminares para uma identificação presuntiva.

Os dados quanto à influência de alguns fatores abióticos sobre o crescimento das amostras têm um importante significado ecológico, ao lado de orientar sobre a margem de segurança e comodidade para o manuseio do microrganismo no laboratório. Assim, observou-se o crescimento de todas as 14 amostras quando colocadas à

Tabela 4 - Características citológica e bioquímico-fisiológicas do A. actinomycetemcomitans em estudo comparativo de 11 autores.

Símbolos: V = Variável; + = Reação positiva; - = Reação negativa; ± = Reação fraca; 1 = King Tatum 1962; 2 = Page King 1966; 3 = Pulvever To 1970; 4 = Meyrs & col. 1971; 5 = Cowan Steel's 1973; 6 = Manual Bergey 1974; 7 = Affias & col. 1978; 8 = Slots & col. 1980b; 9 = Slots 1982a; 10 = Tanner & col. 1982; 11 = Farias & col. 1985

Testes e substratos	Autores/Año (ver legenda)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Fermentação											
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amido	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrina	+	+	V	-	-	V	V	-	V	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Frutose	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Galactose	+	+	V	-	-	-	-	-	-	-	-
Glicose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V	-
Manitol	V	V	V	V	V	+	V	V	V	V	V
Manose	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Melizitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trealose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Xilose	V	V	V	+	V	-	V	V	V	V	V
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase	±	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-
Benzidina	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
β-Galactosidase (ONPG)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrato a nitrito	+	+	-	+	V	+	+	-	+	-	-
Hidrolise											
Amido	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Uréia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP-VM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	±	+	-	-	+	+	+	-	-
Motilidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ativid. hemolítica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Aerobiose	-	-	+	+	-	±	-	-	-	-	-
Ágar de MacConkey	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ágar "SS"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ágar de Levine E.M.B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Capsula	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Total de amostras	33	32	140	2	2	21	136	15	14	-	-

temperatura ambiente (23-25°C), a 28°C e a 37°C. Contudo, houve inibição do crescimento de todas quanto se tentou cultivá-las a 45°C. Verificou-se, ainda, que suportaram crescimento em meios conservados até 45 dias em geladeira e que nenhuma resistiu a 60°C por 30 minutos. Comportamento correspondente foi observado com as cinco amostras de referência. O fato de as amostras terem crescido, embora escassamente, em microaerofilia, à temperatura ambiente, leva a admitir-se que outros fatores poderiam contribuir para mantê-las viáveis no ambiente, como já descrito com relação aos anaeróbios *Bacteroides* pigmentados, isolados de pias e cuspideiras de ambiente ambulatorial (16).

De todas as 19 amostras cultivadas sob diferentes condições atmosféricas, somente duas das 14 isoladas e duas das cinco de referência suportaram crescimento em aerobiose, bastante escasso, crescendo todas nas demais condições de incubação: em microaerofilia (com a mistura gasosa e com vela) e em anaerobiose, com a mistura gasosa CO₂ (10%) e N₂ (90%).

A aparente diversidade de comportamento de algumas amostras sob diferentes condições atmosféricas de cultivo, correspondendo ao descrito na literatura, sugere uma reflexão sobre a possível heterogeneidade do microrganismo atualmente denominado *A. actinomycetemcomitans*, levando a admitir-se um futuro desdobramento em grupos distintos, alguns tipicamente anaeróbios moderados, outros capnófilicos ou microaerófilos e outros verdadeiros facultativos, como aqueles da família Enterobacteriaceae.

Seguramente, como já esclarecido em parte para os *Bacteroides* pigmentados (8, 19, 29), poderemos, num futuro próximo, ver propostas correlações mais precisas entre estes microrganismos, então já diferenciados, e as diversas entidades clínicas de doença periodontal, tendo em vista suas características ecológicas e determinantes de virulência. Nesse sentido, a caracterização sorológica já vem sendo utilizada na tentativa de se determinar a frequência de sorotipos específicos na cavidade oral, em diferentes condições clínicas, e correlacioná-los a essas condições pelo potencial periodopático (36).

Seria importante lembrar o caráter usualmente sinérgistico (sob diversas formas) das infecções periodontais, envolvendo microrganismos anaeróbios exigentes, moderados, facultativos, microaerófilos e capnófilicos, que requer do pesquisador a busca de uma conduta metodológica que garanta melhores condições para isolamento e caracterização dos possíveis agentes envolvidos, já que a situação "in vivo" não será exatamente a reproduzida em laboratório. Acreditamos que esses aspectos sejam levados em conta quando os pesquisadores, ao indicar a metodologia para o estudo de *A. actinomycetemcomitans*, como Slots (28), apesar de reconhecê-lo como capnófilico ou microaerófilo, preconizam a utilização de técnicas que permitam o isolamento de microrganismos mais exigentes do ponto de vista da anaerobiose.

A literatura é absolutamente escassa quanto a dados sobre a viabilidade de *A. actinomycetemcomitans*, citando os autores apenas a preservação sob congelamento a -40°C, por duas semanas (14) e a -80°C, por uma semana (27) e em nitrogênio líquido por alguns meses (31). Com referência à viabilidade das amostras de *A. actinomycetemcomitans*, em cultura, expostas à atmosfera e temperatura ambientes, e sob incubação prolongada, em microaerofilia, observou-se que todas as 19 resistiram até 72 horas, caindo a viabilidade para duas das 14 isoladas e uma das de referência, após 120 horas, nenhuma resistindo a 144 horas de exposição, incluindo-se as cinco amostras-padrão. Todas resistiram a uma incubação prolongada até 15 dias, em microaerofilia; algumas até 30 dias, incluindo-se as de referência, mas nenhuma por 45 dias.

Verificou-se, ainda, que todas as 19 amostras permaneceram viáveis quando estocadas à temperatura de 4°C, em cultura, até 15 dias, resistindo três das isoladas e uma padrão por 30 dias, mas, igualmente, nenhuma por 45 dias.

Os dados analisados mostram a significativa resistência das amostras sob diferentes condições de armazenamento, mesmo expostas ao oxigênio atmosférico. Desse fato ressaltam-se três implicações: a primeira, garantindo um manuseio por maior tempo, sem perda de viabilidade, mesmo sob exposição ao oxigênio; a segunda, relacionada à preservação por um tempo razoável, sem necessidade de recursos sofisticados, e a última, de cunho taxonômico, reforçando os aspectos já abordados.

Os dados da literatura e do presente trabalho sugerem que quando se puder dispor

de uma caracterização taxonômica mais adequada, talvez se possa utilizar de forma objetiva o recurso da indicação racional de determinada atmosfera de incubação como fator de seletividade para isolamento de amostras de *A. actinomycetemcomitans*.

A heterogeneidade do grupo e a diversidade de dados da literatura quanto a alguns aspectos do comportamento bioquímico e fisiológico, particularmente quanto à sensibilidade ao oxigênio, indicam a necessidade de um cuidado muito especial para a reprodução de experimentos e comparação desses dados com aqueles da literatura.

Referências Bibliográficas

- Berthold, P.; Mc Arthur, W.; Evian, C. & Listgarten, M.A. - Immunoelectron microscopic localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis plaque. *IADR Abstr.*, 61:287, 1982.
- Biberstein, E.L. & Gills, M. - Catalase activity of *Haemophilus* species grown with graded amounts of hemin. *J. Bacteriol.*, 81:380-384, 1961.
- Bick, P.H.; Betts, C.A.; Holdeman, L.V.; Miller, G.A.; Ranney, R.R.; Palcanis, K.G. & Tew, J.C. - Polyclonal B-cell activation induced by extracts of Gram-negative bacteria isolated from periodontally diseased sites. *Infect. Immun.*, 34:43-49, 1981.
- Carvalho, M.A.R. - Isolamento, caracterização e conservação de *Bacteroides melanogenicus* da cavidade oral humana. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 1975. (Tese de Mestrado).
- Colebrook, L. - The mycelial and other microorganisms associated with human actinomycosis. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1:197-212, 1920.
- Cowan, S.T. - Cowan and Stell's manual for the identification of medical bacteria. 2.ed. London, Cambridge University Press, 1973.
- Garner, J.G. - Isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* at Auckland Hospital. *New Zealand Med. J.*, 89:384-386, 1979.
- Holborow, D.W. - The aetiology of periodontal disease. *J.N.Z. Soc. Periodontol.*, 55:4-11, 1983.
- Holm, P. - Studies on the etiology of human actinomycosis. I - The other microbes of actinomycosis and their importance. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 27:736-751, 1950.
- Holt, S.C.; Tanner, A.C.R. & Socransky, S.S. - Morphology and ultrastructure of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *Infect. Immun.*, 30:588-600, 1980.
- Irving, J.T.; Newman, M.G.; Socransky, S.S. & Heeley, J.D. - Histological changes in experimental periodontal diseases in rats mono-infected with a Gram-negative organism. *Arch. Oral Biol.*, 20:219-220, 1975.
- King, E.O. & Tatum, H.W. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *J. Infect. Dis.*, 111:85-94, 1962.
- Klinger, R. - Untersuchungen über menschlidre Aktinomykoses. *Centrabl.t F. Bakt. I. Abt, Orig.* 62:191-200, 1912.
- King, E.O. & Tatum, H.W. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *J. Infect. Dis.*, 111:85-94, 1962.
- Krieg, N.R. & Holt, J.G. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.
- Machado, A.D.S.; Carvalho, M.A.R.; Cisalpino, E.O.; Damasceno, C.A.V. & Camilo, M. - Aspectos ecológicos dos Bacteroides produtores de pigmento negro. *Arg. Cent. Est. Cur. Odont.*, 20:129-137, 1983.
- Mandell, R.L. & Socransky, S.S. - A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organisms in juvenile periodontitis. *J. Periodontol.*, 52:593-598, 1981.
- Meyers, B.R.; Bottone, E.; Hirschman, S.Z.; Schneierson, S.S. & Gerschengorn, K. - Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Am. J. Clin. Pathol.*, 56:204-211, 1971.
- Newbrum, E. - Dental plaque ecology related to caries and periodontal diseases. *Aust. Dent. J.*, 24:231-234, 1979.

20. Page, M.I. & King, E.O. - Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *New Eng. J. Med.*, 276:181-188, 1966.
21. Pulverer, G. & Ko, H.L. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: fermentative capacities of 140 strains. *Appl. Microbiol.*, 20:693-695, 1970.
22. Phillips, J.E. - Genus *Actinobacillus*. Brumpt 1910, 849. In: - Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, The Williams & Wilkins, c.8, p.373-377, 1974.
23. Saglie, R.; Newman, M.G.; Carranza, F.A. & Pattison, G.L. - Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. *J. Periodontol.*, 53:217-222, 1982.
24. Slots, J. - The predominant cultivable organisms in juvenile periodontitis. *Scand. J. Dent. Res.*, 84:1-10, 1976.
25. Slots, J. - Subgingival microflora and periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.*, 6:351-382, 1979.
26. Slots, J. - Enzymatic characterization of some oral and nonoral Gram-negative bacteria with api zym sistem. *J. Clin. Microbiol.*, 14:288-294, 1981.
27. Slots, J. - Salient biochemical characters of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Arch. Microbiol.*, 131:60-67, 1982a.
28. Slots, J. - Selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Clin. Microbiol.*, 15:606-609, 1982b.
29. Slots, J. & Genco, R.J. - Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *Dent. Res.*, 63:412-431, 1984.
30. Slots, J.; Reynolds, H.S. & Genco, R.J. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infec. Immun.*, 29:1013-1020, 1980.
31. Tanner, A.C.R.; Visconti, R.A.; Socransky, S.S. & Holt, S.C. - classification and identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* by cluster analysis and deoxyribonucleic hybridizations. *J. Periodontal Res.*, 17:585-596, 1982.
32. Thjotta & Sydnes, S. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* as the role infecting agent in a human being. *Acta Pathol. Scand.*, 28:27-35, 1951.
33. Tsai, C.C.; Sherker, B.J.; Dirienzo, J.M.; Malamud, D. & Taichman, N.S. - Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyxin B. *Infect. Immun.*, 43:700-705, 1984.
34. Vallé, A. & Gaillard, J.A. - Infection pyogène contagieuse de la souris déterminée par *Bacillus actinomycetem-comitans*. *Ann. Inst. Pasteur*, 84:647-649, 1953.
35. Wilkins, T.D.; Wagner, D.L.; Veltri, J.; Gregory, E.M. - Factors affecting catalase by *Bacteroides*. *J. Microbiol.*, 8:553-557, 1978.
36. Zambon, J.J.; Slots, J. & Genco, R.J. - Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal diseases. *Infect. Immun.*, 41:19-27, 1983.

ADERÊNCIA DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA A MACRÓFAGOS: POSSÍVEL PAPEL NA FAGOCITOSE DE MICRORGANISMOS EM PACIENTES NEUTROPÉNICOS

Luiz Eduardo M. Bermudez

Kuzell Institute for Infectious Diseases Research
 Division of Infectious Diseases
 Pacific Prebyterian Medical Center
 2200 Webster Street, Room 305
 San Francisco, California, 94115-1896
 USA

Resumo

A aderência de bactérias, como *Pseudomonas aeruginosa*, aos macrófagos, pode representar o principal mecanismo de fagocitose de bactérias soro-resistentes em pacientes neutropênicos. Este estudo, utilizando macrófagos humanos, cultivados "in vitro", e cepas piliadas e não piliadas de *Pseudomonas aeruginosa*, mostrou que as cepas piliadas podem aderir e serem ingeridas, ao contrário das cepas não piliadas, por macrófagos. Esta aderência pode ser inhibida pela presença de D-galactosídeo, levantando a hipótese que a bactéria liga-se aos macrófagos através de lecitinas presentes em sua superfície.

Summary

Adherence of Pseudomonas aeruginosa to macrophages: possible role in the phagocytosis of microorganisms in neutropenic patients

The bacterial adherence might represent the more important mechanism in phagocytosis of bacteria in neutropenic patients. *Pseudomonas aeruginosa* is related with highest mortality in these patients. In this study, using human macrophages, cultured in vitro, we observed that pilated strains were capable to adhere and be ingested by the macrophages in oposite to non-piliated strains. This adherence was inhibited efficiently by D-galactoside and less efficiently by D-mannoside, rising the hypothesis that this bacteria binds to macrophages surface through surface lectins-like structures.

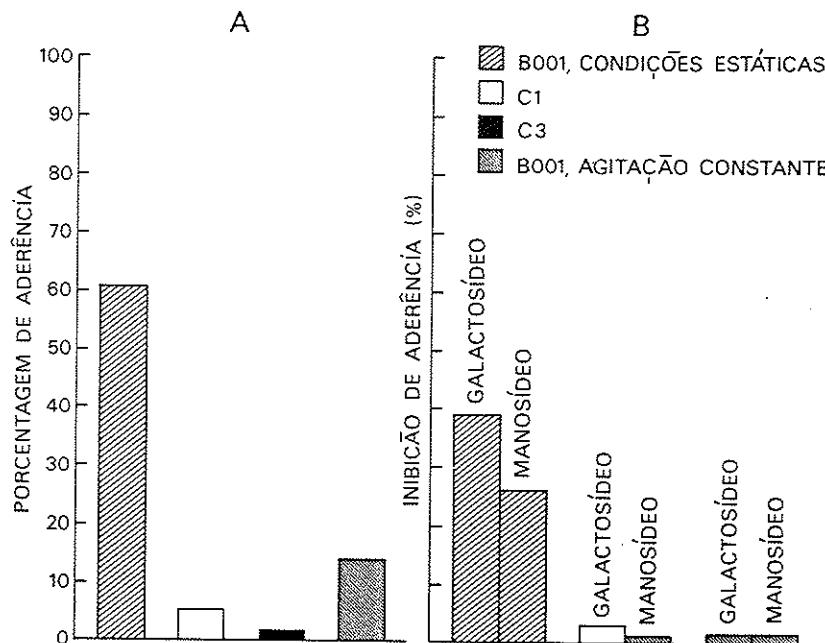
Introdução

Pseudomonas aeruginosa representa um dos patógenos mais frequentemente associados com bacteremia e infecção pulmonar em pacientes imunossuprimidos (14). Indivíduos com câncer, ou ainda aqueles submetidos a diversos tipos de stress por doenças graves (ex.: infarto do miocárdio, traumatismo) têm sua flora normal de orofaringe e intestinos parcialmente ou totalmente substituída por bacilos gram-negativos hospitalares, principalmente *Klebsiella* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (8).

Estudos anteriores realizados por nós e por outros autores mostram que *Pseudomonas aeruginosa* é capaz de se ligar mais avidamente a células bucais e células do epitélio traqueal de pacientes com câncer, do que o são outras bactérias gram-negativas (2, 6, 13). Além disso, outros estudos têm evidenciado receptores específicos para a bactéria no muco do epitélio respiratório (11). Através desses mecanismos, a bactéria é capaz de colonizar e penetrar uma mucosa previamente

ser resistente à opsonização pela via alternativa do complemento. Não há dúvida de que opsoninas séricas (via clássica do complemento e imunoglobulinas) são geralmente requeridas para a fagocitose e morte intracelular da bactéria, pelos leucócitos polimorfonucleares (5). Porém, durante o período de tratamento quimioterápico, os polimorfonucleares são qualitativa e quantitativamente deficientes (Bermudez L.E., Rev. Paulista de Medicina, aceito para publicação), facilitando a invasão e circulação da bactéria no sangue. Não é certo se durante este período, os monócitos e principalmente os macrófagos teciduais possuem algum papel na defesa do hospedeiro, porém, pode-se especular que na ausência de leucócitos polimorfonucleares, as células fagocíticas fixas possam ocupar lugar de destaque como mecanismo de defesa. Então, sem a presença de anticorpos específicos para a bactéria invasora, associada a propriedade da mesma em não ativar a via alternativa do complemento (10, Bermudez L.E.; Fagocitose de *Escherichia coli* soro-resistente por leucócitos polimorfonucleares, Rev. Bras. Biologia, submetido à publicação), o mecanismo de aderência da bactéria ao macrófago assume papel fundamental para a ingestão da mesma.

Figura 1 - A = Aderência de *Pseudomonas aeruginosa*, cepas B001 (piliada após crescimento em condições estáticas, e não piliada, após crescimento sob agitação constante), C1 e C3. Apenas a cepa piliada apresenta aderência significativa (60%); B = Inibição da aderência pelo uso de açúcares. D-galactosídeo e D-manosídeo foram capazes de inibir em 40% e 28%, respectivamente, a aderência da cepa B001, piliada. Não houve inibição quando as cepas utilizadas foram as não piliadas



Nossos resultados mostram que na ausência de anticorpos e do complemento, 60% do inóculo inicial da *Pseudomonas aeruginosa* B001, expressando fimbria em sua superfície, foi capaz de aderir aos macrófagos após 40 minutos de incubação. Mais ainda, esta *Pseudomonas* teve sua aderência ao macrófago inibida em 40% na presença de D-galactosídeo e em 28% na presença de D-manosídeo. *Pseudomonas*

lesada pelo uso de drogas quimioterápicas e/ou radioterapia, e então ganhar a circulação sanguínea. Vários estudos (7, 15, 16) mostraram ser a bactеремia causada pela *Pseudomonas aeruginosa* associada com alta taxa de mortalidade, devido à grande resistência da bactéria aos antibióticos disponíveis, somada à capacidade de resistir aos mecanismos inespecíficos de opsonização e fagocitose.

Portanto, a capacidade dos macrófagos teciduais em retirar a bactéria da circulação poderia ter relação com a sobrevida do paciente durante os períodos de neutropenia. Como a aderência da bactéria à célula fagocítica representa importante etapa na fagocitose, desenvolvemos este estudo a fim de melhor conhecer os mecanismos envolvidos neste fenômeno.

Material e Métodos

Bactérias - As cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidas da coleção do Dr. Lowell Young (B001) e da coleção do Dr. David Speert (C1 e C3). As três cepas foram isoladas do sangue, sendo que C1 e C3 o foram de pacientes com fibrose cística. A cepa B001 é piliada, expressando sua fimbria quando cultivada 24 horas em caldo, sob condições estáticas (hipóxia). Desde que a fimbria parece ter algum papel na adesão da bactéria à célula, seria interessante comparar os resultados obtidos utilizando bactérias piliadas e não piliadas. Para isso, nós utilizamos a cepa B001, cultivada em caldo sob agitação constante para inibir a expressão da fimbria na superfície da bactéria, e as cepas C1 e C3, não piliadas. As bactérias foram cultivadas em ágar sangue a noite e colocadas em caldo "Brain Heart Infusion" (BBL, Cockesville, MD, USA) por 18 horas sob condições estáticas ou de agitação constante. Em seguida, a bactéria foi centrifugada a 1000rpm, durante 20 minutos e lavada duas vezes em solução de Hanks. A suspensão final, em solução de Hanks, foi ajustada para uma concentração de $1,5 \times 10^8$ bactérias/ml utilizando o padrão McFarland.

Macrófagos - 10ml de sangue heparinizado (1:1000) obtidos de um indivíduo saudável, foram centrifugados (volume:volume) com histopaque 1077 (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MI) à 1000rpm durante 10 minutos. Em seguida, a fração monocitica/linfocitica foi ajustada para 10^7 células/ml e colocada em placa para cultura de células, com 24 câmaras de 16mm de diâmetro. A placa foi deixada em estufa à 37°C com 10% de atmosfera de CO₂ em ambiente úmido durante 3 horas, para que os monócitos aderissem à superfície. Após este período, o sobrenadante foi aspirado e as câmaras lavadas com 1ml de Hanks à 37°C, a fim de desprender as células não aderidas. Os monócitos foram então mantidos em cultura com RPMI-1640 (Gibco) suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado. Após 4 dias em cultura, pelo menos 95% das células já haviam se transformado em macrófagos, e foram utilizadas para os experimentos. O teste de exclusão do trypan blue mostrou que 98% das células encontravam-se viáveis no momento do experimento.

Estudo da aderência - 0,5ml de *Pseudomonas aeruginosa* previamente ajustado para $1,5 \times 10^8$ bactérias/ml foi colocado em cada câmara da placa de cultura de células, na presença de 0,5ml de solução de Hanks, ou 0,5ml de uma solução de D-galactosídeo, D-manosídeo ou D-lactose à concentração final de 1,5%. As placas foram então incubadas durante 40 minutos à 37°C, sob agitação constante, com o intuito de aumentar a frequência de choques entre as bactérias e as células fagocíticas. Após este período, o sobrenadante foi retirado e as janelas foram lavadas exaustivamente com solução de Hanks, a fim de desprender as bactérias não aderidas aos macrófagos. Duas câmaras tiveram as células fixadas e posteriormente coradas pelo método de Gram (1), a fim de verificar a presença de bactérias aderidas à placa. Em nenhum dos experimentos realizados foram observadas bactérias aderidas à placa após a lavagem. Os orifícios foram então umedecidos com 0,1ml de água esterilizada gelada e posteriormente raspados utilizando-se uma espátula de borracha. As células foram suspensas em água gelada, estéril, e após 3 minutos, agitadas, em agitador vortex, durante 1 minuto, para produzir lise completa dos macrófagos. Uma amostra da suspensão foi corada pelo método de Giemsa, a fim de confirmar a lise completa das

células. Cem por cento das mesmas encontravam-se lisadas neste estágio do experimento. Em seguida, a suspensão foi diluída a 10^{-5} em água estéril, e 0,1ml da suspensão diluída foi colocada em placa com "Trypticase Soy Agar" (BBL) para a contagem do número de colônias. As placas foram mantidas à temperatura ambiente por 15 minutos e então colocadas em estufa a 37°C durante a noite. No dia seguinte, o número de colônias em cada placa foi contado. Como controle para o experimento, macrófagos e bactérias foram colocados em presença dos açúcares, na mesma concentração utilizada nos experimentos, lavados e utilizados.

Verificação visual da fagocitose - Os macrófagos foram cultivados em placa durante 4 a 5 dias e então expostos à *Pseudomonas aeruginosa*, piliada e não piliada, durante 1 hora a 37°C, em atmosfera de 10% de CO₂ em ambiente úmido. Em seguida, as placas foram exaustivamente lavadas com solução de Hanks, fixadas pelo calor e coradas pelo método de Gram (1). O número de bactérias no interior de 100 células foi contado em cada placa.

Cada experimento foi realizado três vezes, e os dados representam a média aritmética dos resultados obtidos. O desvio padrão está representado na tabela e no gráfico.

Resultados

Pseudomonas aeruginosa cepa B001, piliada, foi fagocitada pelos macrófagos humanos na ausência de soro, observação obtida pela inspeção visual e pelo número de bacilos intracelulares, após a lise das células (Tabela 1).

A fagocitose foi inibida em 40% quando D-galactosídeo foi adicionado ao sistema ($p<0,001$) e em 28% quando o açúcar adicionado foi D-manosídeo ($p<0,02$), porém nenhuma inibição foi observada na aderência quando D-lactose foi o açúcar utilizado. O efeito inibitório foi reversível, isto é, não foi observado quando a bactéria ou o macrófago foram pré-incubados com os açúcares, lavados e então utilizados no experimento.

Quando foi utilizada a *Pseudomonas aeruginosa* B001 que cresceu sob agitação constante, observou-se apenas 10% de aderência a superfície do macrófago, ao contrário dos 60% observados quando o crescimento se deu sob condições estáticas. Os experimentos realizados com *Pseudomonas aeruginosa* C1 mostraram 5% de aderência do inóculo inicial à superfície do macrófago, e com *Pseudomonas aeruginosa* C3 mostraram 1% das bactérias presentes no inóculo inicial aderidas às células (Figura 1). Esta aderência não foi inibida pela presença de açúcares no meio, mostrando que a mesma provavelmente depende de outros fatores e/ou estruturas presentes na superfície das bactérias.

Discussão

Em indivíduos com câncer, sob quimioterapia anti-neoplásica, o período de neutropenia representa a fase de maior risco para a aquisição de uma bacteremia. Durante este período, o indivíduo torna-se suscetível à invasão por bactérias, principalmente aquelas colonizadoras do trato gastro-intestinal. Portanto, a maioria das bacteremias são causadas por bacilos gram-negativos (14). Dentre eles, a *Pseudomonas aeruginosa* possui papel preponderante, principalmente devido a sua capacidade de tornar-se rapidamente resistente aos antimicrobianos disponíveis e

Tabela 1 - Influência de vários açúcares na fagocitose de *Pseudomonas aeruginosa* B001, não opsonizada, por macrófagos humanos

Açúcares (1,5%)	Média de bactérias/macrófago
sem açúcares	12 ± 3,0
D-galactosídeo	5 ± 2,1
D-manosídeo	8 ± 1,6
D-lactose	12 ± 2,3

aeruginosa C1 e C3, não possuidoras de fímbria, não foram capazes de aderir à superfície do macrófago. Esses achados levantam a possibilidade que a cepa B001 de *Pseudomonas aeruginosa* possua 2 tipos diferentes de fímbria em sua superfície. Interessante a observação de que os macrófagos, assim como os polimorfonucleares, possuem receptores de superfície para fímbrias bacterianas (9), e que estes receptores possuem papel relativo, ainda não muito bem conhecido, na fagocitose da bactéria.

Uma questão que permanece sem resposta, é o exato mecanismo pelo qual a *Pseudomonas aeruginosa* adere e é fagocitada pelo macrófago. Cepas piliadas de *Pseudomonas aeruginosa* aderem à células mucosas através da fímbria, como já foi demonstrado por nós e por outros (2, 12). Ao contrário da *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* irá aderir "in vitro" somente à células mucosas previamente tratadas com proteases ou ácido clorídrico. Ambas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* possuem lecitinas capazes de aglutinar eritrócitos. A lecitina da *Escherichia coli* é manose sensitiva, é componente da fímbria e media a aderência a algumas células epiteliais e fagócitos. As lecitinas da *Pseudomonas aeruginosa* aglutinam eritrócitos humanos. Uma, PA I, liga-se especificamente à D-galactose, e a outra, PA II, liga-se à L-fucose, D-manoze, L-galactose e D-frutose (4). Provavelmente, ambas as lecitinas estão presentes na cepa testada, porém, ou existe predominância de PA I ou esta lecitina possui maior afinidade pelo receptor presente na superfície do macrófago, uma vez que o uso de D-galactosídeo produziu inibição mais significativa na aderência ao macrófago.

Bactérias não piliadas poderiam escapar da ação fagocítica dos macrófagos, necessitando da presença de anticorpos específicos e da via clássica do complemento para serem fagocitadas de forma efetiva. Os resultados obtidos em nossos laboratórios mostram que na presença de soro convalescente, os açúcares foram incapazes de induzir qualquer inibição na aderência e fagocitose da bactéria (observação não mostrada). Isto significa que diferentes receptores são responsáveis pela fagocitose opsonina-dependente.

É discutível se os macrófagos possuem papel importante na fagocitose de bactérias durante o período de neutropenia. Nossos dados mostram que eles são capazes de exercer esta função, porém alguma discussão pode ser feita ao redor desta observação. Em primeiro lugar, as altas taxas de mortalidade vistas em pacientes neutropénicos confirmam o conceito de que os mecanismos de defesa precisam de células mais ágeis, como os leucócitos polimorfonucleares. Ao que parece, os macrófagos teciduais não são capazes de proteger o hospedeiro contra organismos possuidores de grande capacidade metastatizante, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Ao mesmo tempo, alguns resultados iniciais indicam que imunoglobulinas anti-*Pseudomonas* e anticorpos monoclonais específicos quando utilizados no início da bacteremia levam a melhores resultados clínicos. Portanto, a presença de opsoninas específicas parece aumentar a eficácia dos macrófagos. Em segundo lugar, existe dúvida se a bactéria quando no sangue expressaria ou não a fímbria em sua superfície. A não expressão representaria um mecanismo de virulência do microrganismo. Como é sabido, a expressão da fímbria está sob controle genético e apresenta grande variação de fase (3). Bactérias isoladas da urina de pacientes com infecção urinária, não expressam fímbrias, apesar de capazes de fazê-lo "in vitro". Finalmente, a presença de concentrações sub-inibitórias de antibióticos, como observado em diversos pacientes fazendo uso de aminoglicosídeos, poderia inibir a produção de fímbria pela bactéria, o que já foi observado in vitro (Bermudez, L.E., dado não publicado).

É então possível concluir que a fagocitose de cepas piliadas de *Pseudomonas aeruginosa*, por macrófagos humanos pode-se realizar através de estruturas semelhantes à lecitina, presentes na superfície da bactéria, a qual liga-se a receptores D-manosídeo e D-galactosídeo na superfície do fagócyto. Porém, o verdadeiro significado desta observação "in vitro", continua desconhecido.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado sob parcial apoio financeiro da bolsa 202072/48 do

Referências Bibliográficas

1. Bartholomew, J.W. - Variables influencing results, and the precise definition of steps in Gram staining as a means of standardizing the results obtained. *Strain Technol.*, 37:139-155, 1962.
2. Bermudez, L.E.; Marques Silva, V.M. & Vidal, E. - Attachment of *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* to the trachea of patients with cancer. 84th American Society for Microbiology Meeting: abstracts, p.307, 1984.
3. Engleber, N.C.; Eisenstein, B.I. - The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases. *N. Engl. J. Med.*, 311:892-901, 1984.
4. Gilboa-Garber, N.; Mizrahi, L. & Garber, N. - Mannose-binding hemagglutinins in extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Biochem.*, 55:975-978, 1977.
5. Howitz, M.A. - Phagocytosis of microorganisms. *Rev. Infect. Dis.*, 4:104-115, 1982.
6. Johanson, W.G.; Pierce, A.K.; & Sanford, J.P. - Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. *N. Engl. J. Med.*, 281:1137-1142, 1969.
7. Sabath, L.D. - Biochemical and physiological basis to susceptibility and resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobial agents. *Rev. Infect. Dis.*, 6:S643-656, 1984.
8. Simpson, W.A. & Beachey, E.H. - Adherence of Group A Streptococci to fibronectin on oral epithelial cells. *Infect. Immun.*, 39:275-280, 1983.
9. Speert, D.P.; Eftkhari, F. & Puterman, M. - Monopsonic phagocytosis of strains of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Infect. Immun.*, 43:1006-1011, 1984.
10. Stevens, P.; Young, L.S. & Adamu, S. - Opsonization of various capsular (K) *Escherichia coli* by alternative complement pathway. *Immunology*, 50:497-502, 1983.
11. Suryanarayana, V. & Ramphal, R. - Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to human tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.*, 45:197-202, 1984.
12. Woods, D.E.; Straus, D.C.; Joahanson, W.G.; Berry, V.K. & Bass, J.A. - Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal epithelial cells. *Infect. Immun.*, 29:1146-1151, 1980.
13. Woods, D.E.; Straus, D.C.; Joahanson, W.G. & Bass, J.A. - Role of fibronectin in the prevention of adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to buccal cells. *J. Infect. Dis.*, 143:784-789, 1981.
14. Young, L.S. - Gram-negative colonization and bacteremia in the compromised host. *Infection*, 10:319-323, 1980.
15. Young, L.S. - The clinical challenge of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.*, 6:S603-607, 1984.
16. Young, L.S.; Wenzel, R.P.; Sabath, L.D.; Pollack, M.; Jennington, J.E. & Platt, R. - The outlook for prevention and treatment of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.*, 6:S769-774, 1984.

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

Elisa Yoko Hirooka

Centro de Ciências Biológicas
Fundação Universidade Estadual de Londrina FUEL
Caixa Postal 6001
86100 Londrina PR, Brasil

& Sonia Presa Caggiani de Salzberg

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

Resumo

A remoção de íons do hidrolizado de caseína, meio NAK, com alumina deu origem ao meio denominado NAKSA. Este tratamento afetou o desenvolvimento de *S. aureus* S-6, obtendo-se células com morfologia alterada, diminuição do peso seco e modificações na produção das proteínas extracelulares; DNase, coagulase e as enterotoxinas A(EEA) e B(EEB), assim como a enzima intracelular desidrogenase lática. A adição de 1,1 μ g/ml de Mg²⁺ ao meio NAKSA teve como efeito a recuperação do peso seco, porém não houve restabelecimento da morfologia celular. Para este valor de magnésio, o nível de DNase aumentou 3,5 vezes em relação ao meio NAK, enquanto que as restantes proteínas extracelulares e intracelulares analisadas, não atingiram os valores obtidos no meio NAK. A quantidade de EEB produzida foi afetada por variações na concentração de magnésio, enquanto que a de EEA permaneceu constante. Em relação à fração das enzimas extracelulares associadas à célula, verificou-se que a DNase superficial liberada pela ação de lisostafina foi aproximadamente 200 vezes inferior à concentração da mesma enzima presente no sobrenadante da cultura. A quantidade de DNase presente na parede celular foi igual à presente nos protoplastos.

Summary

Effect of the ion magnesium on the development and extracellular proteins production of strain Staphylococcus aureus S-6

The ions remotion from the casein hidrolysate NAK medium with alumina originated the NAKSA medium. This treatment affected *S. aureus* S-6 development, resulting in cells with altered morphology, decrease in dry weight and modifications in the extracellular proteins production; DNase, coagulase and the enterotoxins A(SEA) and B(SEB), as well as the intracellular enzyme lactic dehydrogenase. The addition of 1,1 μ g/ml of Mg²⁺ to the NAKSA medium produced a complete recovery of the cell dry weight, but only a partial recovery of the cell morphology. At this magnesium level, the DNase concentration increased 3,5 times as related to the concentration in the NAK medium. On the other hand, the remainder of the exoproteins under study did not achieve the values obtained.

ned in the NAK medium. The SEB production was affected by different levels of magnesium concentration but the SEA level remained constant. Related to the fraction of cell-associated extracellular enzymes, it was observed that superficial DNase released by the lysostaphin action was about 200 times lower than the same enzyme in the culture supernatant. The DNase present in the cell wall was approximately at the same concentration as the one present in protoplasts.

Introdução

O magnésio é considerado um elemento essencial para a integridade celular, já que mantém em funcionamento diversos sistemas celulares (4, 5, 7, 20).

Em *S. aureus*, existe uma boa correlação entre a perda de tolerância ao sal e a perda de magnésio celular (5, 6). A causa da perda de magnésio durante os tratamentos térmicos subletais não está claramente estabelecida, porém os resultados descritos na literatura indicam a possibilidade de que este íon esteja associado a fosfolipídios e ácidos teicóicos, sendo a perda dos primeiros, responsável pela perda do íon magnésio (6).

A linhagem *S. aureus* S-6, utilizada como protótipo na produção de enterotoxina B tem sido estudada em relação aos meios de cultura que permitem uma maior produção da toxina. Os melhores meios são hidrolizados de caseína adicionados de vitaminas (18). Vários meios de composição definida têm sido desenvolvidos com a finalidade de otimizar a produção de enterotoxinas, especialmente meios contendo aminoácidos (10, 14).

O efeito do excesso de magnésio na produção de enterotoxinas foi estudado por alguns pesquisadores (15), porém a literatura é deficiente quanto a estudos do efeito de concentrações iônicas mínimas na produção de proteínas extracelulares. Isto se deve principalmente à dificuldade na remoção seletiva de micronutrientes em meios de culturas complexos, assim como à formulação de meios de composição definida contendo concentrações adequadas dos mesmos.

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de estudar o efeito da concentração do íon magnésio na linhagem *S. aureus* S-6 desenvolvida num meio de hidrolizado de caseína, cujos íons foram esgotados por tratamento com alumina. O efeito do magnésio no crescimento, morfologia celular e na produção de DNase, coagulase e enterotoxinas A e B foi analisado utilizando culturas desenvolvidas em meios contendo concentrações conhecidas de magnésio e outros cátions.

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 amina NAK da Sheffield Chemical Co; Lyndhurst, NJ) na concentração de 4%, adicionado de 10mg/l de niacina e 0,5mg/l de tiamina; b) **Meio NAKSA** - O meio NAK foi tratado com alumina para a remoção de íons e após a adição de niacina e tiamina, denominado meio NAKSA. Este meio contém uma concentração residual de magnésio, de 0,1 μ g/ml; c) **Meio NAKSA com Mg²⁺** - O meio NAKSA foi adicionado de MgSO₄.7H₂O, obtendo-se meios com concentrações do íon compreendidas entre 0,15 e 10,10 μ g/ml.

Determinação da concentração iônica - A concentração iônica nos meios NAK e NAKSA foi determinada por espectroscopia de absorção atômica pelo método de Slavin, utilizando-se espectrômetro Unicam SP 90A série 2.

Inoculo - O inóculo padronizado para todos os experimentos consistiu de 0,1ml de uma diluição 1:5 de uma cultura apresentando absorbância de 0,3 a 600nm, o que

corresponde a 5×10^8 microrganismos.

Condicão de desenvolvimento das culturas - Todas as culturas foram incubadas a 37°C durante 16 horas sob agitação de 200rpm em incubador da New Brunswick Scientific Co, Inc.

Determinação de peso seco - As culturas foram centrifugadas a 10.800xg por 15 min e a seguir 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.

Determinação de proteínas extracelulares - a) **Determinação de DNase** - A DNase foi determinada pelo método semiquantitativo em lâmina (9) e pelo método turbidimétrico quantitativo (2); b) **Determinação de coagulase** - A coagulase foi determinada pelo método em tubo (13) e pelo método quantitativo (17), utilizando-se plasma suíno; c) **Determinação de enterotoxinas** - A enterotoxina A(EEA) foi quantificada pelo método imunoenzimático (3) e a enterotoxina B(EEB) pelo método de Oudin (18).

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

Determinação de desidrogenase láctica - A desidrogenase láctica (LDH) foi determinada no sobrenadante da cultura (11) e na fração celular de estafilococos lisados com 0,1ml de lisostafina na concentração de 500µg/ml a 37°C por 1 hora.

Resultados

Desenvolvimento do microrganismo - Quando o comportamento da linhagem *S. aureus* S-6 comparado nos meios NAK e NAKSA, observou-se que no meio tratado, NAKSA, houve diminuição do número de microrganismos e alteração na morfologia celular. As células desenvolvidas em meio NAK com 0,75µm de diâmetro passaram a valores entre 0,95 e 3,25µm em meio NAKSA. Estas células além de maiores, apresentaram-se bastante heterogêneas, quando observadas após a coloração de Gram (Tabela 1). Algumas células apresentaram coloração Gram-negativa, correspondendo a aproximadamente 10% do total da população. Entretanto, as células que se tingiram como Gram-positivas, apresentaram coloração azul mais intensa do que as células normais. Pelos valores de peso seco (Tabela 1) observa-se que a concentração ótima de Mg²⁺ no meio NAKSA está em torno de 1,11µg/ml. Porém a adição desta quantidade de Mg²⁺ ao meio NAKSA não restabeleceu nem o tamanho, nem o aspecto celular normal. Aumentando a concentração de Mg²⁺ para 10,10µg/ml, houve alteração na morfologia celular, com células heterogêneas de diâmetro entre 0,5 a 1,25µm, assim como diminuição do peso seco.

Enterotoxinas - A produção de EEB foi bastante afetada pela concentração de Mg²⁺ no meio de cultura, não ocorrendo o mesmo com a EEA (Tabela 2). Comparando a quantidade destas toxinas nos meios NAK e NAKSA, observou-se que a produção de EEB foi 18,4 vezes superior no primeiro meio, enquanto que a produção de EEA foi de apenas 1,3 vezes. A produção de EEB no meio NAKSA aumentou gradativamente com o aumento da concentração de Mg²⁺, atingindo 63,0µg/ml para 1,11µg/ml de Mg²⁺, decrescendo até 40,0µg/ml, para 10,10µg/ml do cátion. A EEA atingiu o nível de máxima produção com 0,26µg/ml de Mg²⁺, valor que se manteve constante para concentrações crescentes de Mg²⁺, até 2,12µg/ml.

Tabela 1 - Efeito do magnésio sobre o crescimento e a morfologia de *S. aureus* S-6.**Símbolos:** a = Cocos Gram-positivos; b = Cocos Gram-negativos; p = Desvio padrão

Meio de cultura	Mg ²⁺ (µg/ml)	Peso seco (mg/ml)	Morfologia (coloração de Gram)
1 NAK	2,50	1,23±0,30 ^p	CG(+) ^a pequenos normais com 0,75µm de diâmetro
2 NAKSA	0,10	0,36±0,23	CG(+) heterogêneos, grandes, sendo alguns CG(-) ^b , com 0,95 a 3,25µm de diâmetro
3 NAKSA	0,15	0,33±0,15	CG(+) heterogêneos, grandes, sendo alguns CG(-)
4 NAKSA	0,20	0,55±0,05	CG(+) grandes, porém mais homogêneos do que no meio com 0,1 µg/ml de Mg ²⁺
5 NAKSA	0,26	0,59±0,10	A mesma descrição que para o meio 4
6 NAKSA	0,30	0,63±0,11	A mesma descrição que para o meio 4
7 NAKSA	0,50	0,69±0,14	CG(+) mais homogêneos do que nos meios anteriormente citados
8 NAKSA	0,71	0,76±0,13	CG(+) homogêneos, tamanho tendendo à normalização
9 NAKSA	1,91	0,96±0,18	CG(+) homogêneos
10 NAKSA	1,11	1,16±0,20	CG(+) homogêneos, porém maiores do que os normais (meio NAK) com 0,95µm de diâmetro
11 NAKSA	1,51	1,20±0,03	A mesma descrição que para o meio 10
12 NAKSA	2,12	1,31±0,08	A mesma descrição que para o meio 10
13 NAKSA	5,10	1,29±0,04	A mesma descrição que para o meio 10
14 NAKSA	10,10	0,88±0,05	CG(+) heterogêneos, com 0,50 a 1,25µm de diâmetro

Tabela 2 - Efeito de magnésio na produção de EEA e EEB em *S. aureus* S-6.**Símbolos:** a = Enterotoxina estafilocócica A; b = Enterotoxina estafilocócica B; c = Não determinado

Meio de cultura	Mg ²⁺ (µg/ml)	EEA ^a (µg/ml)	EEB ^b (µg/ml)
NAK	2,50	0,643	80,0
NAKSA	0,10	0,489	4,4
NAKSA	0,15	0,362	4,3
NAKSA	0,20	0,354	6,0
NAKSA	0,26	0,548	9,6
NAKSA	0,30	0,542	12,8
NAKSA	0,50	0,513	17,6
NAKSA	0,71	0,616	43,2
NAKSA	0,91	0,575	51,0
NAKSA	1,11	0,628	63,0
NAKSA	1,51	0,603	60,0
NAKSA	2,12	0,590	62,0
NAKSA	5,10	ND ^c	ND
NAKSA	10,10	ND	40,0

Tabela 3 - Efeito de magnésio na produção de DNase e na liberação de desidrogenase lática em *S. aureus* S-6.**Símbolos:** a = Ágar azul de ortotoluidina - contendo DNA; b = Desidrogenase lática; c = Não detectado; d = Não determinado

Meio de cultura	Mg ²⁺ (µg/ml)	TDA ^a (mm)	DNase Turbidimetria (µg/ml/min)	LDH ^b (µU/ml)
NAK	2,50	4,64	28,45	NDE ^c
NAKSA	0,10	3,0	2,75	NDE
NAKSA	0,15	3,9	5,92	ND ^d
NAKSA	0,20	4,5	9,55	ND
NAKSA	0,26	5,0	26,44	ND
NAKSA	0,30	4,0	19,40	ND
NAKSA	0,50	5,0	35,33	NDE
NAKSA	0,71	5,2	49,55	ND
NAKSA	0,91	5,3	48,55	ND
NAKSA	1,11	5,2	89,33	NDE
NAKSA	1,51	5,0	85,56	ND
NAKSA	2,12	5,0	87,03	NDE
NAKSA	5,10	ND	85,38	NDE
NAKSA	10,10	ND	82,22	ND

DNase - O método quantitativo permitiu observar que pequenas variações na concentração de Mg²⁺ produziram alterações significativas na produção de DNase (Tabela 3). A adição de Mg²⁺ estimulou a produção de enzima a partir de 0,15µg/ml de Mg²⁺, atingindo o valor máximo para 1,11µg/ml, o qual permaneceu constante até 10,10µg/ml. Esta concentração enzimática foi três vezes superior ao valor obtido no meio NAK.

Coagulase - A determinação de coagulase pelo método em tubo não permitiu detectar variações na produção de enzima para as diferentes concentrações de íon Mg^{2+} , porém estas foram detectadas pelo método quantitativo (Tabela 4). No meio NAKSA com 0,1 μ g/ml de Mg^{2+} , a atividade foi 4,5 vezes menor que no meio NAK, aumentando gradativamente com a adição do íon, até atingir um valor bastante próximo ao apresentado no meio NAK, com 1,11 μ g/ml de Mg^{2+} . Este valor permaneceu constante até 5,1 μ g/ml de Mg^{2+} , porém verificou-se uma diminuição de 50%, para 10,10 μ g/ml de Mg^{2+} (Tabela 4).

Localização da atividade de enzimas extracelulares ligadas - A atividade de nuclease ligada, tanto na fração liberada pela lisostafina como na fração retida nos protoplastos foi bastante inferior, aproximadamente 200 vezes, à atividade presente nos respectivos sobrenadantes das culturas (Tabela 5).

Quando se compara a DNase liberada pela lisostafina e a retida nos protoplastos, não se observam diferenças significativas nas duas frações celulares (Tabela 5). Na mesma Tabela observa-se que nas células desenvolvidas no meio NAKSA, a quantidade de DNase ligada foi menor do que à produzida em organismos desenvolvidos na concentração ótima de Mg^{2+} (1,11 μ g/ml de Mg^{2+}). Por outro lado, a quantidade de DNase ligada às células desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA + 1,1 μ g/ml de Mg^{2+} foi idêntica.

Tabela 4 - Efeito de magnésio na produção de coagulase em *S. aureus* S-6

Meio de cultura	Mg^{2+} (μ g/ml)	Coagulase	
		Método em tubo	Método turbidimétrico (μ g de fibrinogênio/ml)
NAK	2,5	4+	1610
NAKSA	0,1	2+	365
NAKSA	0,4	3+	890
NAKSA	0,6	3+	960
NAKSA	1,1	4+	1440
NAKSA	2,1	4+	1150
NAKSA	5,1	4+	1440
NAKSA	10,1	3+	770

Tabela 5 - Tratamento das células de *S. aureus* S-6 com lisostafina: DNase liberada e DNase retida nos protoplasmos.

Símbolos: a = μ g/ml de Mg^{2+}

Meio de cultura	DNase	
	(μ g/ml) Liberada	Retida
NAK	0,394	0,461
NAKSA	0,083	0,089
NAKSA + 0,4 Mg ^a	0,072	0,289
NAKSA + 0,6 Mg	0,250	0,422
NAKSA + 1,1 Mg	0,467	0,489
NAKSA + 2,1 Mg	0,439	0,494
NAKSA + 5,1 Mg	0,583	0,522
NAKSA + 10,1 Mg	0,350	0,517

Efeito de Mg^{2+} na produção de LDH - A produção de LDH foi afetada pela concentração de Mg^{2+} no meio (Tabela 6). A atividade de LDH atingiu o valor de 128,9 μ g/ml para 1,11 μ g/ml de Mg^{2+} , mantendo-se constante para todas as concentrações subsequentes. Esta atividade correspondeu a aproximadamente 50% do valor observado nas células desenvolvidas em meio NAK.

Discussão

A adição de 1,11 μ g/ml de Mg^{2+} ao meio NAKSA propiciou o restabelecimento das propriedades parcialmente inibidas no meio NAKSA, porém não restabeleceu completamente o tamanho celular (Tabelas 1, 2, 3, 4). Uma possível explicação para esta recuperação incompleta seria que durante o tratamento do meio com alumina ocorresse a eliminação de outros íons, além de Mg^{2+} , necessários para o crescimento normal do microrganismo. Adicionando os íons Ca^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} e Cu^{2+} na

concentração original no meio NAK ao meio NAKSA + 1,11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} houve uma recuperação parcial do tamanho celular, porém as células apresentaram-se maiores que no meio NAK.

As alterações celulares devido à deficiência de Mg^{2+} (Tabela 1) são condizentes com os resultados obtidos por Webb (21) com bacilos e Walker & Duffus (20) com leveduras, onde ocorreu o aparecimento de células gigantes de formas aberrantes, com viabilidade reduzida. Provavelmente o Mg^{2+} atuaria como regulador do tamanho celular (20).

Em relação às enterotoxinas, a produção de EEB foi bastante afetada por variações na concentração de Mg^{2+} , não podendo-se dizer o mesmo em relação a EEA. Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por Markus & Silverman (12), e explicaria em parte a ocorrência maior de cepas produtoras de EEA, assim como o maior número de surtos devido a estas cepas.

Quanto às enzimas extracelulares, a produção de coagulase nos meios NAKSA e NAKSA modificado sempre foi inferior à produzida no meio NAK. Entretanto a atividade de DNase no meio NAKSA + 1,11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} foi três vezes superior à do meio NAK (Tabela 3). A maior liberação de DNase neste meio não pode ser explicada como injúria a nível de membrana celular, já que todos os sobrenadantes analisados apresentaram-se negativos para LDH (Tabela 3). Pelo contrário, a presença de Mg^{2+} estabiliza a membrana citoplasmática (19). Também não se deve à ativação da enzima pelo Mg^{2+} , já que a adição do íon a sobrenadantes do meio NAK não alterou significativamente a atividade de DNase (dados não apresentados). Este efeito poderia ser explicado pelo aparecimento de grande número de vesículas mesossómicas na presença de certos íons (8), o que levaria a uma maior produção de exoenzimas. Além disso, o aumento da força iônica até um valor ótimo parece estimular a conversão de enzimas ligadas à forma extracelular, estabilizando e ativando as proteases responsáveis pela liberação das exoenzimas (8).

Em relação à fração enzimática associada ao microrganismo, observamos que a nuclease presente na superfície celular (Tabela 5) foi bastante inferior à mesma enzima presente no sobrenadante (Tabela 3), diferindo dos dados obtidos por Okabayashi & Mizuno (16), onde um quarto da atividade nucleásica em *S. aureus* 209 P estava ligada às células. A diferença encontrada nestes dois trabalhos pode ser devido a diferenças nas linhagens utilizadas.

A quantidade de nuclease liberada das células pela lisostafina foi similar à quantidade retida nos protoplastos (Tabela 5). A diferença entre a concentração de enzima no sobrenadante e nas duas frações celulares obtidas indica que a nuclease uma vez produzida logo atinge o meio exterior, sem se acumular na parede celular.

A quantidade de nuclease ligada às células, desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA + 1,11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+} foi idêntica, o que parece confirmar que a menor atividade de DNase extracelular no meio NAK (Tabela 3) não se deve à retenção desta enzima na superfície celular.

Quanto à coagulase, não se detectou nenhuma atividade nas células tratadas com lisostafina (protoplastos). Segundo Engels & Kamp (1), a não demonstração de coagulase ligada deve-se ao uso de células que não produzem grande quantidade desta enzima, aliada à sensibilidade da metodologia que não permite a sua detecção. Provavelmente ambas as explicações seriam adequadas para os resultados negativos nesta pesquisa, já que *S. aureus* S-6 produz pouca coagulase quando comparada com outras linhagens e o método utilizado foi menos sensível que o utilizado por Engels & Kamp (1).

Tabela 6 - Desidrogenase lática em células de *S. aureus* S-6 desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA adicionados de magnésio.

Símbolos: a = Desidrogenase lática; b = Não detectado; c = $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Mg^{2+}

Meio de cultura	LDH ^a ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
NAK	233,3
NAKSA	N.D. ^b
NAKSA + 0,4 Mg ^c	28,9
NAKSA + 0,6 Mg	100,0
NAKSA + 1,1 Mg	128,9
NAKSA + 2,1 Mg	128,9
NAKSA + 5,1 Mg	106,7
NAKSA + 10,1 Mg	126,7

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 6, em concentrações de Mg²⁺ inferiores a 1,11 µg/ml houve diminuição na concentração da enzima intracelular LDH. Assim, pode-se inferir que além de uma modificação na permeabilidade das estruturas externas do microrganismo, houve também um efeito inibitório a nível de síntese protéica, já que o íon Mg²⁺ é importante na estabilidade dos ribossomos (7).

Agradecimentos

Pelo fornecimento de enterotoxinas e respectivos antisoros, agradecemos ao Dr. Merlin S. Bergdoll e Mary L. Evenson do Food Research Institute, Wisconsin, USA; pelas microfotografias a Dra. Débora Q. Tavares e ao CNPq pela ajuda concedida na forma de bolsa de estudo para a primeira autora deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Engels, W. & Kamp, M.A.F. - Secretion of staphylocoagulase by *Staphylococcus aureus*: the role of a cell-bound intermediate. *Ant. van Leeuwen.*, 47:509-524, 1981.
2. Erickson, A. & Deibel, R.H. - Turbidimetric assay of staphylococcal nuclease. *Appl. Microbiol.*, 25:337-341, 1973.
3. 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.
4. Hoving, H.; Koning, J.H. & Robillard, G.T. - *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: role of divalent metals in the dimerization and phosphorylation of enzyme I. *Biochem. (Wash.)*, 21:3128-3136, 1982.
5. Hurst, A.; Hughes, A.; Collins-Thompson, D.L. & Shah, B.G. - Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.*, 20:153-158, 1971.
6. Hurst, A.; Hughes, A.; Duckworth, M. & Baddiley, J. - Loss of D-alanine during sublethal heating of *Staphylococcus aureus* S-6 and magnesium binding during repair. *J. Gen. Microbiol.*, 89:277-284, 1975.
7. John, A.C. & Goldberg, A.L. - Effects of starvation for potassium and other inorganic ions on protein degradation and ribonucleic acid synthesis in *E. coli*. *J. Bacteriol.*, 143:1223-1233, 1980.
8. Kim, T.K.; Hammond, J.B. & Chiplel, J.R. - Chemical and electron microscopic studies of factors associated with penicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Ant. van Leeuwen.*, 45:581-593, 1979.
9. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar diffusion methods for detection staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971.
10. Mah, R.A.; Fung, D.Y.C. & Morse, S.A. - Nutritional requirements of *Staphylococcus aureus* S-6. *Appl. Microbiol.*, 15:866-870, 1967.
11. Marbach, E.P. & Weil, M.H. - Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. *Clin. Chem.*, 13:314, 1967.
12. Markus, Z.H. & Silverman, G.J. - Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Microbiol.*, 20:492-496, 1970.
13. Meyer, W. - Über die brauchbarkeit des koagulasetestes mit verschiedenen plasmaarten zur differenzierung von *Staphylococcus aureus* - stämmen. *Zbl. Bakt. I. Abt. Orig.*, 209:465-481, 1966.
14. 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.
15. 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.

16. Okabayashi, K. & Mizuno, D. - Surface-bound nuclease of *Staphylococcus aureus*: localization of the enzyme. *J. Bacteriol.*, 117:215-221, 1974.
17. Pereira, J.L. & Salzberg, S.P. - Dosagem da enzima estafilocoagulase através da coagulação de fibrinogênio. 9º Congresso Latinoamericano de Microbiologia, São Paulo, julho de 1983.
18. Reiser, R.F. & Weiss, K.F. - Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. *Appl. Microbiol.*, 18:1041-1043, 1969.
19. Scherzer, R. & Gerhardt, P. - Influence of magnesium ions on porosity of the *Bacillus megaterium* cell wall and membrane. *J. Bacteriol.*, 114:888-890, 1973.
20. Walker, G.M. & Duffus, J.H. - Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. *J. Cell Sci.*, 42:329-356, 1980.
21. Webb, B. - The influence of magnesium on cell division. I - The growth of *Clostridium welchii* in complex media deficient in magnesium. *J. Gen. Microbiol.*, 2:275-287, 1948.

INFECCIÓN URINARIA POR HAEMOPHILUS INFLUENZAE

Gustavo Prieto
 Carmen de Marín
 Ada Martínez
 & Eglis Leal

Centro Regional de Referencia Bacteriológica
 Hospital Universitario de Maracaibo
 Facultad de Medicina
 Universidad del Zulia
 Maracaibo Venezuela

Resumen

En 13137 urocultivos procesados en el período 1982-1984 utilizando una metodología que incluye el medio gelosa chocolate (GC) se detectan 10 (0.07%) casos producidos por *Haemophilus influenzae*, ocurriendo 9 de ellos en niños cuya edad oscila entre 1-11 años. De los aislamientos 9 resultan no tipables serológicamente. A cada uno de los biotipos II y III pertenecen 4 de los aislamientos. Los 10 aislamientos son uniformemente sensibles a 13 antibióticos estudiados. Son llamativos los altos niveles de sensibilidad con porcentajes acumulativos de inhibición para el 100% de los aislamientos para cefoperazona (0.006 μ gr/ml), cefotaxima (0.025 μ gr/ml) y ampicilina (0.2 μ gr/ml), logrando esta última curación clínica y bacteriológica en 6 casos en los cuales se utilizara. El análisis de costo y la relación costo-efectividad establece un valor elevado (\$588) por caso. El urocultivo convencional negativo en orinas con piuria estéril y/o positividad microscópica de la orina sin centrifugar, especialmente si provienen de niñas con antecedentes de infección urinaria recurrente y/o anomalías del tracto urinario justifican la inclusión del agar chocolate en el urocultivo para descartar el *H. influenzae* como agente etiológico de la infección.

Summary

Urinary infection by Haemophilus influenzae

In 13137 urine cultures performed in the period 1982-1984 using a methodology that included the media chocolate agar, 10 (0.07%) cases due to *Haemophilus influenzae* were detected, 9 of them occurring in girls 1 to 11 years old. Nine isolates were non-serotypable. To each one of biotypes II and III belong four isolates. All 10 isolates were sensitive to 13 antibiotics studied. High levels of susceptibility were found with 100% of the isolates been inhibited by cefoperazone (0.006 μ g/ml), cefotaxime (0.025 μ g/ml) and ampicillin (0.2 μ g/ml). Clinical and bacteriological efficacy of therapy was achieved in 6 cases in which ampicillin was used. Cost analysis and the relationship cost-effectivity allowed establish a high value (\$588) for case. A negative conventional urine culture in urine with sterile pyuria and/or microscopy positivity of the uncentrifuged urine, specially if it belongs to girls with known recurrent urinary infections with/or urinary tract abnormalities, justified the inclusion of chocolate

agar in the urine cultures in order to rule out *Haemophilus influenzae* as the etiologic agent.

Introducción

La infección del tracto urinario por *Haemophilus influenzae* tanto en adultos como en niños ha sido reportada infrecuentemente (1, 3, 4, 11). Su verdadera incidencia es aún materia a ser establecida a lo cual ha contribuido el fracaso para detectar la presencia de *Haemophilus influenzae* de los métodos utilizados rutinariamente en el cultivo de la orina. Por esta misma razón aún no se ha logrado conocer a plenitud la relación de serotipos y biotipos de *Haemophilus influenzae* a la infección urinaria, ello a diferencia de lo que se conoce en relación a su capacidad para producir infección meníngea y otras infecciones (2, 9, 10, 11, 14, 18).

El propósito de este estudio es establecer en nuestro medio la incidencia de la infección urinaria por *Haemophilus influenzae* y su relación a los serotipos y biotipos de ésta bacteria.

Materiales y Métodos

Muestras clínicas - Durante el periodo 1982-1984 un total de 13137 urocultivos son procesados por la búsqueda de *Haemophilus influenzae*, en dos instituciones hospitalarias; Hospital Universitario de Maracaibo (9801) y Hospital Clínico de Maracaibo (3336).

Procesamiento - La muestra de orina se siembra utilizando el método cuantitativo de recuento de colonias de acuerdo a la siguiente técnica: 0.1ml de la orina y de sus diluciones 10^{-2} y 10^{-4} en solución salina fisiológica es colocado en tres placas de MacConkey: orina pura, 10^{-2} y 10^{-4} , en dos placas de agar sangre humana: orina pura y 10^{-4} y en una placa de Gelosa Chocolate (GC): 10^{-2} , ésta última incubada en atmósfera de 10% CO_2 . Todas las placas se incuban durante 24-48 horas a 35°C para proceder a realizar el contejo de colonias. Cuando hubo dificultad en establecer el recuento de colonias de *Haemophilus influenzae* en la placa de GC con dilución de 10^{-2} , orina pura y diluciones seriadas 10^{-2} y 10^{-4} fueron realizados en este medio. Recuentos iguales o superiores a 10^4 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por ml de orina es tenido como significativo de infección.

Identificación - Para la identificación de *Haemophilus influenzae* se utiliza su característica de crecimiento y morfología colonial en placas de GC, morfología y afinidad tintorial al Gram, ausencia de hemólisis, satelitismo en agar sangre, producción de catalasa en lámina, requerimientos nutricionales según los criterios establecidos por Zinneman y Biberstein (2) y utilización de carbohidratos de acuerdo a Killian (10). La identificación serológica se determina mediante reacción de coaglutinación utilizando Phadebact *Haemophilus* test (Pharmacia Diagnostic Piscataway, N.J.). El biotipaje se realiza siguiendo a Killian (10).

Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos - La susceptibilidad y resistencia a los agentes antimicrobianos es establecida mediante el método del disco único de alta potencia de Bauer & Kirby, utilizando el medio de Mueller Hinton Chocolatado y suplementado (1% de hemoglobina y 1% de Isovitalex) (8).

La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) es determinada por dilución seriada en tubos utilizando caldo Mueller Hinton suplementado con 1% de Isovitalex. El inóculo es 10^5 bacterias por ml(8).

Producción de betalactamasa - En su detección se utiliza el método acidimétrico de Escamilla (5).

Resultados

De los urocultivos procesados, 3001 (22.84%) resultan positivos y de ellos 10 lo son a *Haemophilus influenzae*, lo cual representa para esta bacteria una positividad de 0.07% en relación al número total de urocultivos estudiados y de 0.36% en relación al número total de urocultivos positivos. De los 10 urocultivos positivos a *Haemophilus* 9 pertenecen a niñas cuyas edades oscilan entre 1 y 11 años. El otro caso se produce en un adulto de 20 años de edad del sexo masculino. Los pacientes presentaban sintomatología clínica de infección urinaria, en 3 de ellos se establece el diagnóstico de incontinencia urinaria, glomerulonefritis focal y hematuria recurrente. Este último y otros 2 pacientes tuvieron reinfecciones del tracto urinario.

En 8 de los casos de infección urinaria por *Haemophilus influenzae* este es el único agente bacteriano aislado, en un caso se acompaña de *Enterobacter cloacae*, este último en cantidad superior a 10^5 UFC por ml de orina y en el caso restante lo hace de *Staphylococcus epidermidis*, el cual crece en la placa de Agar sangre con orina pura en cantidad insignificante (60UFC/ml), pero que permite, al producir espontáneamente el fenómeno de satelitismo, orientar inicialmente aun más el diagnóstico etiológico de la infección hacia *Haemophilus influenzae*. En 7 de los urocultivos, *Haemophilus influenzae* está presente en cantidades superiores a 10^5 UFC por ml de orina, en los 3 restantes se le aísla en cantidades superiores a 10^4 UFC por ml de orina.

La Tabla 1 muestra para los 10 aislamientos de *Haemophilus influenzae* los resultados de los estudios bacteriológicos que permiten caracterizarlos como tales. Los aislamientos muestran uniformidad del 100% a la positividad o negatividad para dichos estudios.

Todos los 10 aislamientos se muestran uniformemente sensibles a los siguientes agentes antimicrobianos: ampicilina, cefalosporinas de primera generación, cefotaxima, cefoxitina, cefamandol, cefoperazona, cloramfenicol, kanamicina, streptomicina, tetraciclinas, sulfas, gentamicina y tobramicina.

La Tabla 3 muestra los niveles de sensibilidad en $\mu\text{gr}/\text{ml}$ para ampicilina, cloramfenicol, cefoxitina, cefamandol, cefotaxima y cefoperazona. Son llamativos los niveles altos de sensibilidad, con porcentajes acumulativos de inhibición para el 100% de los aislamientos, de cefoperazona ($0.006\mu\text{gr}/\text{ml}$), cefotaxima ($0.025\mu\text{gr}/\text{ml}$) y ampicilina ($0.2\mu\text{gr}/\text{ml}$). Evolución hacia la curación bacteriológica y clínica fue lograda en 6 pacientes con este último antibiótico.

La investigación de betalactamasa en estos 10 aislamientos muestran que ellos están desprovistos de ésta enzima.

Tabla 1 - *Haemophilus influenzae*. 10 aislamientos estudios bacteriológicos

Estudio Bacteriológico	Reacción
Bacilos Gram negativo, pleomórficos	+
Satelitismo	+
Hemólisis	-
Catalasa	+
Requerimientos nutricionales:	
Factor X	-
Factor V	-
Factor XV	+
Utilización de:	
Glucosa	+
Sucrosa	-
Lactosa	-
Xilosa	+
Ribosa	+

Discusión

Varios autores han reportado ocasionalmente sobre la patogenicidad de miembros del género *Haemophilus* en el tracto urinario (1, 3, 4, 6, 7, 19). Nuestra casuística constituida por 10 casos es cuantitativamente importante cuando se le compara a la presentada por otros (4, 6, 19). Los casos reportados en niños son escasos, la mayoría de estos produciéndose en niñas, sexo al cual también pertenece

todos nuestros casos pediátricos. Ello pudiera tener origen en la más frecuente colonización o infección del tracto genitourinario por *Haemophilus* en el sexo femenino (1, 3, 13). Todos nuestros casos son producidos por *Haemophilus influenzae*.

De los aislamientos 9/10 son no tipables serológicamente lo cual concuerda con lo reportado por otros (3, 6, 19). Los biotipos II (40%) y III (40%) predominan entre ellos. Ambos biotipos han sido reportados por Albritton y col. (3) y GagreKidan y col. (6) en el tracto genitourinario.

Estos aislamientos a diferencia de lo reportado por Albritton y col. (3) no muestran aún desarrollo de resistencia a los agentes antimicrobianos, lo cual hace a estos *Haemophilus* y los aislados en nuestro medio a partir de LCR, líquido pleural y tracto respiratorio, diferentes en este sentido a los reportados por varios autores (1, 2, 3, 12, 15, 16, 17).

Tabla 3 - *Haemophilus influenzae* 10 aislamientos niveles de sensibilidad en µgr/ml. Símbolos: * = Número total de cepas sensibles para la concentración referida; ** = Porcentaje de cepas sensibles para la concentración referida

Antibioticos	Nº de cepas estudiadas	0.006	0.012	0.025	0.05	0.1	0.2	0.4	0.8	1.6	3.2	6.4µgr/ml
Ampicilina	10					7	10					
%						(70)	(100)					
Cloramfenicol	10									5	10	
%										(50)	(100)	
Cefoxitina	10								8	10		
%									(80)	(100)		
Cefamandol	10							8	10			
%								(80)	(100)			
Cefotaxima	10			8	10							
%				(80)	(100)							
Cefoperazona	10		10*									
%			(100)**									

Nuestros aislamientos al igual que los estudiados por Burns y col. (4) son betalactamasa negativa.

En este estudio, utilizando para su detección la metodología adecuada, la incidencia encontrada es sólo de 0.07%, la cual resulta comparable a la reportada por Burns y col. (4), usando también los medios adecuados para el urocultivo. Ello es indicativo de que realmente la infección urinaria por *Haemophilus influenzae* es infrecuente.

La evaluación de la incidencia de ésta infección mediante un análisis de costo en base a la metodología utilizada en este estudio, en la cual una placa de G.C. (\$0.46) sustituye a una placa de agar sangre (\$0.09), con un incremento de \$0.44 por muestra, establece un costo de \$588 por caso, lo cual permite concluir en relación a costo efectividad para la población por nosotros atendida, en la cual la incidencia de este tipo de infección por *Haemophilus influenzae* es baja, que el costo del descubrimiento de cada caso es muy elevado. No obstante, en pacientes con

Tabla 2 - *Haemophilus influenzae*. 10 aislamientos biotipaje y serotipaje

Biotipo	Biotipos		Serotipos	
	Nº de cepas	Serotipo	Nº de cepas	
I	2	b	1	
		no tipable	1	
II	4	no tipable	4	
III	4	no tipable	4	

anomalidades del tracto urinario, infecciones recurrentes y especialmente en aquellos cuyo examen de orina revela existencia de piuria estéril por producir cultivos bacteriológicamente negativos, *Haemophilus influenzae* tiene una buena probabilidad de ser el agente etiológico y su detección con el uso de los medios adecuados una necesidad. En este sentido el examen microscópico de la orina sin centrifugar pueda también ser de utilidad para sugerir el uso del agar chocolatado durante el cultivo de la orina en especial en aquellos en quienes la correlación microscópica-cultivo convencional no pueda establecerse.

Referencias Bibliográficas

1. Albritton, W.; Hammond, G. & Ronald, A. - Bacteremic: *Haemophilus influenzae* genitourinary tract infections in adults. Arch. Intern. Med., 138:1819-1821, 1978.
2. Albritton, W.; Penner, S.; Slaney, L. & Brunton, J. - Biochemical characteristics of *Haemophilus influenzae* in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. J. Clin. Microbiol., 7:519-523, 1978.
3. Albritton, W.; Brunton, J.; Meier, M.; Bowman, N. & Slaney, L. - *Haemophilus influenzae*: comparison of respiratory tract isolates with genitourinary tract isolates. J. Clin. Microbiol., 16:826-831, 1982.
4. Burns, T.; Hinds, D. & Hawkins, E. - *Haemophilus* organisms: urinary tract pathogens in children? Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 2:251-253, 1984.
5. Escamilla, J. - Susceptibility of *Haemophilus influenzae* to ampicillin as determined by use of a modified one minute beta lactamase test. Antim. Agent and Chemother., 9:196-198, 1976.
6. Gagre-Kidan, T.; Lipsky, A. & Plorde, J. - *Haemophilus influenzae* as a cause of urinary tract infections in men. Arch. Intern. Med., 144:1623-1627, 1984.
7. Hall, G. & Washington, J. - *Haemophilus influenzae* in genitourinary tract infections. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 1:65-67, 1983.
8. Finegold, S. & Martin, W. - Determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents: assay of antimicrobial agents. 6.ed. St. Louis, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. St. Louis, C.V. Mosby, p.266-279, 1982.
9. Kilian, M. - A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. J. Gen. Microbiol., 93:9-62, 1976.
10. Kilian, M. - *Haemophilus*. In: - Lennette, E.; Ballows, A.; Hausler, W. & Truant, J., eds. - Manual of clinical microbiology. 3.ed. Washington D.C., American Society for Microbiology, p.330-336, 1980.
11. Kilian, M.; Søfensen, I. & Frederiksen, W. - Biochemical characteristics of 130 recent isolates from *Haemophilus influenzae* meningitis. J. Clin. Microbiol., 9:409-412, 1979.
12. Laufs, R.; Riess, F.; Jahn, C.; Fock, R. & Kaulfers, P. - Origen de *Haemophilus influenzae* R factores. J. Bacteriol., 147:563-568, 1981.
13. McCormack, W.; Evrard, J.; Laughlin, C.; Rosner, B.; Alpert, S.; Crockett, V.; McComb, D. & Zinner, S. - Sexually transmitted conditions among women college students. Am. J. Obstet. Gynecol., 139:130-133, 1981.
14. Prieto, G.; Pineda, M.; de Zabala, N.; de Torres, A. & Martínez, A. - Frecuencia etiológica de las meningitis en el Hospital Universitario de Maracaibo. Rev. Invest. Clin. sup., 1:57, 1983.
15. Prieto, G.; Pineda, M.; de Zabala, N.; de Torres, A. & Martínez, A. - Susceptibilidad a los agentes antimicrobianos de los microorganismos más frecuentemente aislados del LCR. Rev. Invest. Clin. sup., 1:58, 1983.
16. Prieto, G.; de Marín, C. & Martínez, A. - Estado actual de la sensibilidad del *Haemophilus influenzae* a los agentes antimicrobianos incluyendo ampicilina y cloramfenicol. Memorias XIV Jornadas Venezolanas de Microbiología, Caraballeda, 1984.
17. Prieto, G.; de Marín, C. & Martínez, A. - Sensibilidad del *Haemophilus influenzae* a las cefalosporinas incluyendo cefotaxima y cefoperazona. Memorias XIV Jornadas Venezolanas de Microbiología, Caraballeda, 1984.
18. Prieto, G.; de Marín, C. & Martínez, A. - Bictipos y serotipos de *Haemophilus*

- influenzae* y su relación a la procedencia del especímen clínico. Memorias XIV Jornadas Venezolanas de Microbiología, Caraballeda, 1984.
- 19. Schmit, K. - Isolation of *Haemophilus* in urine cultures from children. J. Pediatr., 95:565-566, 1979.
 - 20. Zinnemann, K. & Biberstein, E. - Genus *Haemophilus*. In: - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. New York, Williams & Wilkins, p.364-365, 1974.

CARACTERIZAÇÃO SOROLÓGICA DE AMOSTRAS DE *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* ISOLADAS DE PEIXES CAPTURADOS NO LITORAL BRASILEIRO

Ernesto Hofer
& Carlos Henrique Debenedito Silva

Deptº de Bacteriologia
Instituto Oswaldo Cruz Fiocruz
Caixa Postal 926
21040 Rio de Janeiro RJ

Resumo

Em 82 peixes de origem marinha e de diferentes espécies, capturados na faixa de litoral compreendida entre Bahia e Rio Grande do Sul, foram detectados 45 ou 54,8% portadores de *Vibrio parahaemolyticus*, propiciando o isolamento de 71 culturas. Na caracterização sorológica (O:K), 13 sorotipos foram identificados (24 ou 33,7%) e 47 ou 66,1% das amostras só permitiram o reconhecimento da estrutura "O". Os sorotipos mais incidentes foram: 02:K28; 05:K17; 01:K32 e 02:K12; nos grupos sorológicos predominaram 02; 04; 05 e 03. Não foi evidenciado qualquer vínculo de espécies de peixes com determinados sorotipos ou sorogrupos tampouco, os níveis de isolamento sofreram a influência da sazonalidade.

Summary

Serological characterization of strains of Vibrio parahaemolyticus isolated from fishes caught off the Brazilian coast

From the corporeal surface of 82 marine fish caught off the Brazilian coast (line from Bahia to Rio Grande do Sul), 45 (54.8%) of animals were detected bearing *Vibrio parahaemolyticus*, from which 71 strains were taken. In the serological characterization (O:K), 13 serotypes were identified (24 or 33.7%) and 47 (66.1%) cultures permitted to recognize only the somatic antigenic structure "O". The most serotypes frequent were: 02:K28; 05:K17; 01:K32 and 02:K12 and in the serological groups the predominance was: 02; 04; 05 and 03. No relationship was formed between the fish species and the serological types or groups; the level of isolation did not have any influence from seasonality.

Introdução

As investigações realizadas nos dois últimos decênios, abordando a ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho, como nas águas costeiras ou de estuários, no sedimento e nos componentes de sua fauna, já constituem um notável acervo bibliográfico (10), avolumando-se ainda mais com aquelas que retrataram os processos entéricos humanos, relacionados com surtos de toxinfecção de origem alimentar, em certas regiões do mundo (10).

Considerando a extensa faixa litorânea do país, aliada ao crescente beneficiamento e utilização dos produtos do mar como fonte de alimentos, discretas são as informações em nosso meio, sobre a incidência de *V. parahaemolyticus*, tanto do meio ambiente (1, 6, 7, 9, 12, 14) e ainda mais, no comprometimento humano (8). O problema se torna mais crucial quando se depara com a carência de informações

sobre os sorotipos identificados nas pesquisas nacionais, razão pela qual, o trabalho é apresentado com o intuito de fornecer subsídios às análises bacteriológicas e epidemiológicas futuras.

Material e Métodos

Foram analisados 82 peixes marinhos, representados por diferentes espécies, capturados na faixa costeira entre Abrolhos (Bahia) até Rio Grande (R.G. Sul) e cobrindo todos os períodos sazonais.

As metodologias empregadas na colheita das amostras, isolamento e identificação bioquímica das culturas de *Vibrio parahaemolyticus* e evidenciação do fenômeno de Kanagawa, foram previamente descritas por Hofer & Silva (10).

As culturas identificadas bioquimicamente como *V. parahaemolyticus* foram analisadas preliminarmente do ponto de vista, sorológico, com o intuito de caracterizar o antígeno de envoltório K, empregando-se oito anti-soros polivalentes OK produzidos em nosso laboratório, seguindo as recomendações de Sakazaki & col. (16). A confirmação e complementação das análises antigenicas O e K das amostras, foi realizada pelo Dr. M. Ohashi do Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Japão.

Resultados

Da superfície externa dos peixes examinados foram reconhecidos 45 exemplares (54,8%), albergando *V. parahaemolyticus*, resultando no isolamento de 71 amostras (Tabela 1). No cômputo geral, as culturas apresentaram o perfil bioquímico característico da espécie e nenhuma revelou positividade no teste de Kanagawa.

A análise sorológica (O:K) evidenciou 13 sorotipos (24 ou 33,7%) e um considerável número de amostras (47 ou 66,1%) em que não foi possível caracterizar a estrutura de envoltório -K, isto é, não tipável com os anti-soros conhecidos (Tabela 2). Todavia, as culturas permitiram a identificação do antígeno somático "O", concentrando-se 92,9% da amostragem entre os sorogrupos 01 a 05, com destacada predominância do grupo 02 (53,5%) e ocorrendo em todas as áreas de captura (Tabela 2).

O maior número de peixes portadores de bactéria se originou dos litorais dos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, entretanto, destaca-se o elevado índice de tipos sorológicos de *V. parahaemolyticus* obtido de três animais de Santa Catarina (Tabela 2).

Outro aspecto, refere-se a presença de 14 peixes carreando dois tipos sorológicos diferentes e um, portador de quatro sorogrupos/sorotipos. Como um dos constituintes mais incidentes nas associações, figura 02:K NT (não tipável), compartilhando principalmente, com os tipos antigenicos 01:KNT; 02:K12; 03:KNT; 04:K13; 04:K42; 05:KNT e 10:KNT. Este acontecimento predominou entre os peixes capturados em São Paulo, Santa Catarina e R.G. Sul, representados por exemplares de batata, cherne pouveiro, castanha, corvina, olhete e xerelete.

Discussão

Observa-se um crescente interesse pelo estudo da ecologia microbiana em ambientes aquáticos, delineando inicialmente, a flora natural ou autóctone, no sentido de uma definição da estrutura das comunidades e sua expressão em espécies. As atenções também se voltaram para a esfera sanitária, tendo em vista, que vários representantes da fauna se constituem em receptáculos e veículos de microrganismos, potencialmente patogênicos para o homem. Um exemplo típico dessa situação, recai sobre o gênero *Vibrio*, com as espécies: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. fluvialis*, *V. cholerae* não 01, *V. furnissii* e *V. mimicus* (2, 13).

Excetuando-se, *Vibrio cholerae* 01, a maior ênfase nas pesquisas se concentrou sobre *V. parahaemolyticus*, reconhecido como um dos principais agentes de processos

Tabela 1 - Frequência e origem das espécies de peixes portadores de *Vibrio parahaemolyticus*.

Símbolos: *Negativos = Caçolete 4, Viola 3, Serra 1, Xareu 1, Maria-mole 1 e Mulato 1; Total = 11; **BA = Bahia; ES = Espírito Santo; RJ = Rio de Janeiro; SP = São Paulo; SC = Santa Catarina; RS = Rio Grande do Sul; Desc. = Desconhecida

Espécies (nomes vulgares)	Nº exemplares examinados*	Nº portadores	Origem dos peixes**						
			BA	ES	RJ	SP	SC	RS	Desc.
Badejo	7	4	2	1	1	-	-	-	-
Corvina	7	4	-	-	-	-	-	4	-
Batata	6	5	-	-	2	1	2	-	-
Garoupa	6	4	1	3	-	-	-	-	-
Cherne	5	4	-	1	2	-	-	1	-
Cicoba	5	2	-	2	-	-	-	-	-
Namorado	5	2	-	-	2	-	-	-	-
Pargo	4	2	-	-	1	-	-	1	-
Dourado	4	1	-	-	-	-	-	-	1
Tainha	4	1	-	-	1	-	-	-	-
Xerelete	3	3	-	-	1	1	-	1	-
Cherne pouveiro	3	2	-	-	-	-	-	2	-
Cangulo	2	2	1	1	-	-	-	-	-
Atum	2	1	1	-	-	-	-	-	-
Cambucu	1	1	-	-	1	-	-	-	-
Enchova	1	1	-	-	-	-	-	1	-
Castanho	1	1	-	-	-	-	-	1	-
Linguado	1	1	-	-	-	1	-	-	-
Olhete	1	1	-	-	-	-	1	-	-
Pampo	1	1	-	-	-	-	-	1	-
Pescadinha	1	1	-	-	1	-	-	-	-
Vermelho	1	1	1	-	-	-	-	-	-
Total	71	45	6	8	12	3	3	12	1

ubiquidade no universo marinho.

Os resultados, consignados na Tabela 1, confirmam a ampla disseminação de *V. parahaemolyticus* nas diversas espécies de peixes capturados nesta faixa do litoral. Aliás, tais dados não divergem frontalmente do ponto de vista qualitativo, com aqueles apresentados pelos autores nacionais (1, 6, 7, 12, 14), embora apenas dois trabalhos (6, 7) tivessem analisado o problema em relação aos peixes, obtendo 41,6 e 10% de portadores da bactéria, respectivamente.

O aspecto mais crítico nas referências nacionais, se concentra na caracterização da espécie em sorogrupos e ou sorotipos, assinalada apenas por Leitão & col. (12), Gelli & col. (7) e Rodrigues (14). Esta particularidade poderá ser relevada até certo ponto, considerando que Fishbein & Wentz (4) e principalmente, Sakazaki (15), reconheceram que o esquema antigênico proposto para *V. parahaemolyticus* está mais dirigido para as amostras isoladas da espécie humana. Quanto aquelas de origem ambiental, nem sempre é possível uma definição das estruturas somática e de envoltório, representando por vezes até mais de 60% das culturas (5), como também foi detectada na presente investigação, na qual 66% das amostras não possibilitaram a identificação do antígeno K.

Baseado em tal circunstância, os referidos autores (4, 15) aconselham que o diagnóstico bacteriológico deve se limitar às características morfo-tintoriais, ao perfil bioquímico e ao teste de Kanagawa.

Conquanto a identificação sorológica ocupe um plano secundário, em certas situações como nos surtos de toxinfecção de origem alimentar, poderá ofertar dados às análises epidemiológicas. Por outro lado, admite-se que a verificação dos tipos sorológicos ocorrentes em regiões não endêmicas, não deixam de representar nosso litoral, admitindo-se que as influências impostas pela sazonalidade, tão evidente em outras áreas do mundo (11), não apresentam a mesma repercussão nas

Tabela 2 - Distribuição dos tipos sorológicos de *V. parahaemolyticus* em relação as espécies portadoras e as áreas de captura dos peixes.

Símbolos: *NT = Não tipável; ** = Regiões de captura

Sorotipos	Nº amostras	%	Regiões de captura						Peixes portadores	
			Sorogrupo "0"	BA ¹	ES ²	RJ ³	SP ⁴	SC ⁵	RS ⁶	
1 : 32	2	7			+		+			Namorado ^{3**} - Batata ⁵
1 : NT*	3			+		+				Badejo ¹ - Batata ³
2 : 12	2					+			+	Batata ³ - Corvina ⁶
2 : 28	8	53,5		+		+			+	Canguló ³ - Xerelete ³
2 : NT	28			+	+	++	+	+	+	Cherne pouveiro ⁶
										Atum, Vermelho ¹ - Garoupa ²
										Badejo, Cambucu, Pargo
										Pescadinha, Tainha ³ -
										Linguado ⁴ - Olhete ⁵ -
										Castanho, Corvina, Enchova,
										Pampo ⁶ , Dourado ⁷ - Badejo ^{1,2}
										Batata ^{3,4} - Cherne ^{3,6} -
										Xerelete ^{4,6}
3 : 20	1	9,8			+					Cherne
3 : NT	6			+	+		+	+	+	Badejo ¹ - Garoupa ²
4 : 13	1									Xerelete ⁴ - Batata ⁵ - Corvina ⁶
4 : 34	1	11,3				+				Batata
4 : 42	1									Namorado
4 : NT	5						+	+		Olhete
5 : 15	1				+					Garoupa, Cioba ² - Batata ⁵ -
5 : 17	3	11,3				+				Cherne pouveiro ⁶
5 : 30	1									Badejo
5 : NT	3									Cherne ³ - Corvina, Pargo ⁶
6 : 46	1	1,4				+				Cherne pouveiro
7 : 19	1	1,4			+					Garoupa, Cioba ² - Castanho ⁶
10 : NT	1	1,4								Canguló
11 : 51	1	2,8								Garoupa
11 : NT	1									Corvina
										Cioba
										Namorado

informações de importância, para os futuros ensaios bacteriológicos, ecológicos e epidemiológicos.

Sob o prisma sorológico, em confronto com as investigações nacionais realizadas (7, 12, 14) salienta-se o caráter ubíquidário desse microrganismo, pela gama variável de sorotipos detectados. Entretanto, alguns tipos sorológicos foram comuns, como nos casos de 01:K32; 02:K28; 04:K42; 05:K17 e 07:K19. Assinala-se que o sorotipo 05:K17 já foi incriminado como agente de um caso de gastrite humana, ocorrido no Ceará (8).

É lógico que inúmeros fatores podem exercer uma influência sobre a heterogeneidade dos tipos identificados pelos vários autores, sugerindo-se como hipóteses, o local e os espécimes analisados; os fatores físicos, químicos e biológicos ocorrentes nos ecossistemas estudados, assim como a metodologia bacteriológica empregada.

Na esfera ecológica, salienta-se, com base nos resultados da Tabela 2, que não houve, em relação às espécies de peixes, considerando suas características de habitat e do tipo de alimentação, um vínculo com determinado sorotipo ou sorogrupo. A detecção de *V. parahaemolyticus* foi evidenciada, indiferentemente, em espécies bentônicas e pelágicas, portanto nas condições mais variáveis impostas por um ecossistema aquático aberto. É interessante destacar que esse aspecto diverge do conceito de que a maior incidência de *V. parahaemolyticus* ocorra em áreas mais sujeitas à poluição, particularmente em baías e estuários (3).

Em síntese, os resultados obtidos demonstram a ampla difusão do microrganismo em de toxinfecção alimentar, em determinadas regiões do mundo e por sua extraordinária

condições analisadas, provavelmente em decorrência da temperatura da água, sempre superior a 10°C. Assim, a estabilidade do sistema ecológico é mantida, quer do ponto de vista qualitativo ou quantitativo, em relação aos diferentes constituintes dessa cadeia alimentar.

Agradecimentos

Ao Dr. M. Ohashi, diretor do Deptº de Microbiologia do Tokyo Metropolitan Research Laboratory of Public Health, Japão, pela confirmação da caracterização sorológica das amostras e aos técnicos Deise Paranhos e Maria Severina Pinheiro.

Referências Bibliográficas

1. Barros, G.C. & Vianni, M.C.E. - *Vibrio parahaemolyticus*: isolamento e identificação em águas da Baía de Guanabara. Rev. Lat-amer. Microbiol., 22:163-169, 1980.
2. Blake, P.A.; Weaver, R.E. & Hollis, D.C. - Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Ann. Rev. Microbiol., 34:341-367, 1980.
3. Colwell, R.R.; Kaper, J. & Joseph, S.W. - *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* and other vibrios: occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, 198:394-396, 1977.
4. Fishbein, M. & Wentz, B. - *Vibrio parahaemolyticus*: methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. J. Milk Food Technol., 36:118-123, 1973.
5. Fishbein, M.; Wentz, B.; Landry, W.L. & Mac Eachern, B. - *Vibrio parahaemolyticus* isolates in the U.S., 1969-1972. In: - Fugino, T.; Sakaguchi, R. & Takeda, Y., eds. - Intern. Symp. on *Vibrio parahaemolyticus*, Tokyo, Saikou Pub., p.53-58, 1974.
6. França, S.M.C.; Gibbs, D.L.; Samuels, P. & Johnson, W.D. - *Vibrio parahaemolyticus* in Brazilian coastal waters. J. Amer. med. Ass., 244:587-588, 1980.
7. Gelli, D.S.; Tachibana, T. & Silva, T.M.P. - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus* em ostra e outros produtos marinhos no litoral de São Paulo: revisão e considerações sobre o risco potencial para a saúde pública. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 35/36:9-16, 1975.
8. Hofer, E. - Primeiro isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* no Brasil de infecção gastrointestinal humana. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 14:174-175, 1983.
9. Hofer, E. & Silva, C.H.D. - Isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* de material de peixes de origem marinha. In: - Anais V Cong. Bras. Microbiologia, R.J., 1974.
10. Hofer, E. & Silva, C.H.D. - An evaluation of the efficiency of enrichment media in the isolation process for *Vibrio parahaemolyticus*. Zbl. Bakt. Hyg. A, 256:456-465, 1984.
11. Kaneko, T. & Colwell, R.R. - The annual cycle of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. Microb. Ecol., 4:135-155, 1978.
12. Leitão, M.F.F. & Arina, H.K. - *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo. I - Ocorrência na água e avaliação da metodologia para isolamentos. Col. Inst. Tecnol. Alimentos, 6:149-166, 1975.
13. Morris Jr., J.G. & Black, R.E. - Cholera and other vibrioses in the United States. New England J. Med., 312:343-350, 1985.
14. Rodrigues, D.P. - Ocorrência de bactérias potencialmente patogênicas no ecossistema água-ostra da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, RJ. Rio de Janeiro, U.F.R.J., 1983. (Tese de Mestrado).
15. Sakazaki, R. - Control of contamination with *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods and isolation and identification of the Vibrio. In: - Hobbs, B.C. & Christian, J.H.B., eds. - The microbiological safety of food. London, Academic Press, p.375-385, 1973.
16. Sakazaki, R.; Iwanami, S. & Tamura, K. - Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. II - Serological characteristics. Jap. J. Med. Sci. Biol., 21:313-324, 1968.

VIBRIO SPECIES FROM THE WATER-OYSTER ECOSYSTEM OF SEPETIBA BAY IN
RIO DE JANEIRO STATE, BRAZIL*

Dália dos Prazeres Rodrigues
& Ernesto Hofer

Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz
Department of Bacteriology
Caixa Postal 926
21041 Rio de Janeiro RJ, Brazil

Summary

The presence of members of the genus *Vibrio* was evaluated in 30 samples of oysters and the surrounding sea water of their environment, collected in different stations of Sepetiba Bay, in Rio de Janeiro State, during a period of one year (1981/1982). Five hundred and seventy-six cultures were obtained from the sample analysed. The biochemical profile of the isolated, lead to the classification of 390 strains in seven species: Non-01 *V. cholerae* (65.12%), *V. alginolyticus* (13.84%), *V. parahaemolyticus* (11.02%), *V. fluvialis* (6.66%), *V. harveyi* (1.53%), *V. damsela* (1.28%) and *V. vulnificus* (0.51%). Considerations on the outcome of different enrichment media lead to the conclusion of the necessity of making use of a scheme consisting of alkaline peptone water with 1g% of NaCl associated with alkaline nutrient broth 2g% of NaCl with or without addition of 200mg% of eosine Y and passage in Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose Agar (TCBS).

Resumo

Caracterização de espécies do gênero Vibrio do ecossistema água-ostra da Baía de Sepetiba, RJ, Brasil

Avaliou-se a presença de membros do gênero *Vibrio* em 30 amostras de ostras e número correspondente de água do mar recolhidas em diferentes pontos da Baía de Sepetiba, RJ, durante o período de 1 ano (1981-82). A análise possibilitou o isolamento de 576 culturas de *Vibrio* das quais a classificação bioquímica permitiu a caracterização de 390 em 7 espécies, assim distribuídas: *V. cholerae* não-01 (65,12%); *V. alginolyticus* (13,84%); *V. parahaemolyticus* (11,02%); *V. fluvialis* (6,66%); *V. harveyi* (1,53%), *V. damsela* (1,28%) e *V. vulnificus* (0,51%). Considerações sobre o comportamento de diferentes meios de enriquecimento foram efetuadas, as quais demonstraram a necessidade da utilização de um esquema constituído de água peptonada alcalina com 1g% de NaCl associado ao caldo nutritivo (Difco) alcalino com 2g% de NaCl, com ou sem adição de 200mg% de eosina amarela e passagem em agar TCBS.

Introduction

The marine environment presents a variable microbiota which in some situations

*Part of the Ph.D. thesis of the first author.

can affect and change the sanitary quality of products, which are consumed by the populations.

The more incriminated individuals in this case are the bivalves because of their physiological mechanism of nutrition, characterized by filtration and capture of nutrients from the water which allows the introduction and retention in their bodies of innumerable microorganisms.

Foodborne illness caused by marine bacteria usually is associated with consumption of raw seafoods. The oyster is the only mollusk that is generally eaten raw.

Regarding to the microbial flora of oyster (3, 18) indicate that *Vibrio*, *Pseudomonas Achromobacter*, *Flavobacterium* and *Micrococcus* species were predominant. In addition, the frequency of this flora is in some extent constant in oyster and in other mollusks (14).

Evidence is rapidly accumulating which indicates that some *Vibrio* species, can by different ways be harmful to humans, as for example *V. cholerae* O1; Non-O1 *V. cholerae*, have also been referred to as nonagglutinable (NAG) or non-cholera vibrios (NCVs); *V. parahaemolyticus*; *V. vulnificus*; *V. fluvialis* (Group F or EF-6 vibrios); *V. furnissii*; *V. damsela*; *V. hollisae* and *V. mimicus*. These species are responsible for sporadic cases and outbreaks of enteritis as well as for outer-intestinal infections in humans (2, 4, 15, 23, 24).

The purpose of the present study was to provide some informations on the incidence of the different *Vibrio* species in the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay, in Rio de Janeiro State, Brazil.

Material and Methods

Sampling - 30 samples of oysters (*Crassostrea brasiliensis*) and water that involve the natural bivalves banks were collected at thirty stations located in Sepetiba Bay during the period of January 1981 to December 1982 (Figure 1).

In each collection, 20 to 30 oysters and 500ml of water were collected in sterilized bottles. The specimens were transported to the laboratory in a insulated container at 5-10°C. Samples usually were examined within 12 hours after collection.

Laboratory examination - The oysters were washed and brushed to remove the excess of dirty, opened and the contents (flesh and liquor), used for examination (1). Normally 15 to 20 shucked oysters were utilized to obtain a 100ml volume which was then blended for 1 min at 2000rpm in a sterile Waring blender. Appropriate quantities of oyster homogenate and sea water was inoculated directly onto plates of Thiosulphate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS, Difco) and incubating at 37°C for 24 hours.

In the enrichment process following media, distributed in volumes of 20ml per tube, were applied:

- a. Alkaline peptone water - pH 8.4 with 1g% NaCl (APW 1%);
- b. Alkaline peptone water - pH 8.4 with 3g% NaCl (APW 3%);
- c. Nutrient broth (Difco) - pH 8.3 with 2g% NaCl (NB);
- d. Nutrient broth (Difco) - pH 8.3 supplemented with 2g% NaCl and 200mg% eosin Y - Difco (ENB).

The basal medium APW contained 1% Bacto-Peptone (Difco) which was sterilized at 121°C for 15 min. Eosin Y was added to the Nutrient Broth as aqueous solution (1g%) previously heated at 100°C for 30 min.

Enrichment media were inoculated with 1ml of samples and incubated at 37°C for 24 hours and subcultured onto TCBS agar plates. After overnight incubation at 37°C, 3 to 5 typical suspect *Vibrio* colonies per plates of TCBS agar (yellow and blue-green colonies) were picked onto Kligler Iron Agar (Difco).

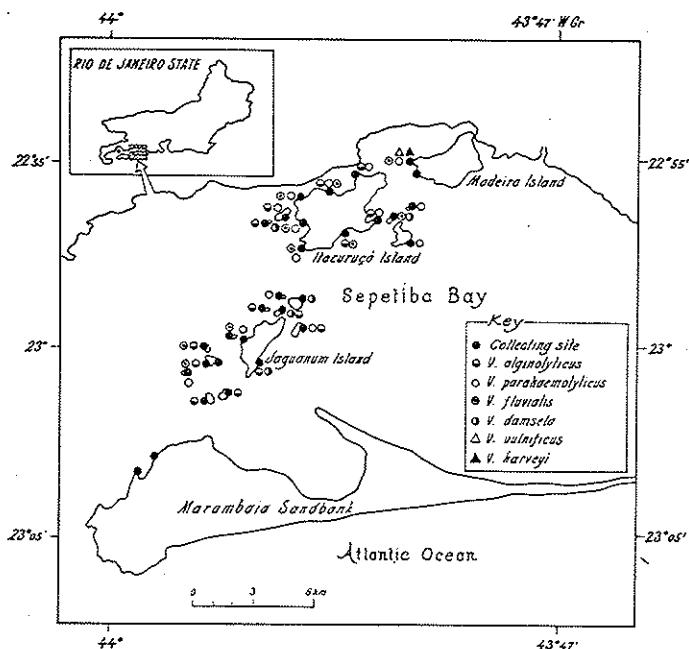
Identification of vibrios - The primary screening test for all isolates was Kovac's oxidase. Organisms negative were discarded and the remainder were identified by using the following tests: fermentative activities of carbohydrates (glucose,

mannitol, lactose, sucrose, arabinose and mannose); production of indol and sulphide hydrogen in SIM medium; nitrate reduction; ability to decarboxylate lysine, ornithine or arginine; methyl red and Voges-Proskauer reactions; growth in several NaCl concentrations (0, 3, 6, 8, 10%) and sensibility to 2,4-diamino-6,7 diisopropylpteridine (0/129) phosphate (9, 24).

All strains of *V. cholerae* belonging to Heiberg's Group I (sucrose +, arabinose -, mannose +), which revealed growth in 0 to 3g% NaCl, were screened for agglutination test with the O and R antisera immediately after isolation.

Cultures identified as *V. parahaemolyticus* were analyzed their response to the Kanagawa test, according to the recommendation of Sakazaki (20). The preliminary serological characterization was made through K polivalents antisera and identification of serovars was done by Dr. R. Sakazaki, National Institute of Health, Tokyo, Japan.

Figure 1 - Sampling stations in Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, RJ



Results

From the 30 samples of oysters and water collected from different spots of Sepetiba Bay included in this study, 576 strains of *Vibrio* sp. has been recovered out of them, 258 from water and 318 from bivalves samples.

The analysis of the biochemical profile of the isolated strains lead to the classification of 390 cultures in seven species of the genus *Vibrio* (Table 1), standing out the absence of *V. cholerae* 01. The distribution of vibrios species in the sampling stations is shown in Figure 1.

Preliminary, the occurrence of the species is heterogeneous. Non-01 *V. cholerae*, *V. alginolyticus* and *V. vulnificus* revealed a greater number of isolations from the sea water samples while the remaining species presented a higher percentage of occurrence in the mollusks. Results of the application of different media are indicated in Table 2.

Table 1 - Frequency of *Vibrio* species isolated from the oysters and water of Sepetiba Bay, RJ

Vibrio species	Origin					
	Sea Water		Oysters		Total	
	Nr.	%	Nr.	%	Nr.	%
Non-01 <i>V. cholerae</i>	140	35.89	114	29.23	254	65.12
<i>V. alginolyticus</i>	43	11.02	11	2.82	54	13.84
<i>V. parahaemolyticus</i>	12	3.07	31	7.94	43	11.02
<i>V. fluvialis</i>	5	1.28	21	5.38	26	6.66
<i>V. harveyi</i>	3	0.76	3	0.76	6	1.53
<i>V. damsela</i>	1	0.25	4	1.02	5	1.28
<i>V. vulnificus</i>	2	0.51	-	-	2	0.51
Total	206	52.82	184	47.17	390	99.9

Table 2 - Distribution of *Vibrio* species according to the environment and to the isolation media employed.

Symbols: a = Primary plating; b = Peptone water, pH 8.4 with 1g% NaCl; c = Peptone water, pH 8.4 with 3g% NaCl; d = Nutrient broth pH 8.3 with 2g% NaCl; e = Nutrient broth pH 8.3 with 2g% NaCl and 200mg% eosin Y

Vibrio species	Water				Oysters			
	TCBS ^a	PW1% ^b	PW3% ^c	NB ^d	TCBS	PW1%	PW3%	NBE ^e
Non-01 <i>V. cholerae</i>	32	30	35	43	34	17	29	34
<i>V. alginolyticus</i>	7	5	12	19	3	3	4	1
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	3	7	2	2	10	8	11
<i>V. fluvialis</i>	-	3	1	1	2	7	6	6
<i>V. harveyi</i>	3	-	-	-	3	-	-	-
<i>V. damsela</i>	-	1	-	-	1	1	-	2
<i>V. vulnificus</i>	-	-	-	2	-	-	-	-
Total	42	42	55	67	45	38	47	54

From the stock biochemically identified as *V. parahaemolyticus*, fifteen were serologically characterized (Table 3), thus making the identification of 11 different serovars possible. It is to be noted that only one serotype was detected in the oysters and in the sea water, though from different sites of collection. Also no culture showed hemolysis in the Kanagawa test.

Discussion

In the sea water environment of a bay the fauna and flora of the shores are more subjected to the interference of complex abiotic factors, whether combined or not, play an important role in the micro and macroscopic components of this ecosystem (19). When studying oysters that live in such an environment we must bear in mind that because of their nutritional physiology (typical of filtrators), the chance of the retaining in their organisms ubiquitous species belonging to this bioma may be classified as a normal event in levels highly superior to those, for example, encountered in the pelagic region.

From the sanitary point of view this event turns out to be very serious once that the oysters can be consumed "in natura", thus favoring the vehiculations of toxico-infectious (6, 22) and other agents of different etiology as for example the virus of hepatitis (6). The role of a natural reservoir the oysters perform favors the dissemination of other microorganisms, including marine vibrios which also find a favorable environment in the human organism and thus are capable to develop infectious diseases in the human host (2, 5).

Was verified in this study and there is a strong similarity between the species isolated from the bivalves and those found in the liquid media in which these animals live, in both areas of collections, off shore and close to the littoral. This result ratifies the capability of the oysters of retaining particles filtrated during the feeding mechanism (3). In this respect it stands out as a particularity the fact that from the seven identified species of *Vibrio*, only two, *V. alginolyticus* and *V. vulnificus*, did not reveal an equal or greater concentration in the oysters in relation to the sea water (Table 1).

Evaluating the outcome of enrichment media, as shown in Table 2, the following aspects stand out: 1. The process of direct placing (TCBS agar) for the detection of the majority of *Vibrio* species, mainly from oysters, is efficient. 2. The quantity level was best obtained in the nutrient broth - 2g% of NaCl, followed by alkaline peptone water - 3g% of NaCl for the sea water sample with similar results for the oyster samples for which eosin Y was added to the nutrient broth. 3. The quality level results were equivalent in the use of alkaline peptone water as well as in the use of the two formulas of nutrient broth (through alkaline peptone water 1g% outmatched its homonym with 3g% of NaCl).

Non-O1 *Vibrio cholerae* predominated in relation to the number of isolates obtained (Table 1). It was present in 30 collection points indifferently whether in the oyster or in the sea water environment (Figure 1). This finding indicates the relevance of *Vibrio cholerae* under the ecologic point of view and the possible repercussion of epidemiologic nature that this phenomenon may represent in the mechanisms of introduction of the microorganism in the consumers of this sea product. It also explains the growing compromise of the human host in this event already referred to by Blake & col. (2) and De Paola (5).

Vibrio parahaemolyticus, a recognized agent of food toxinfection, was detected in 14 different stations of Sepetiba Bay. Characteristics of this species were: greater incidence of isolations from mollusks (Table 1), extraordinary diversity of serovars (Table 3), and absence of hemolysin responsible for the positive results in the Kanagawa test (adopted as a parameter in the detection of pathogenic and non-pathogenic strains). All of these particularities are in agreement with those described by Sakazaki (21), Fishbein & Wentz (7), Hofer & Silva (10, 11), Leitão & col. (16) and Gelli & col. (8).

As to the occurrence of *V. alginolyticus* in 16 areas (53,3%) a peculiar phenomenon was the higher frequency of this species in the sea water than the one found in the oysters. From the ecologic point of view this result is in agreement with those obtained in many parts of the world pointing out its ample distribution in the sea environment with a discreet active part in the human host (2, 4, 15, 23).

Among the more recently described species recognized as agents in the pathologic processes in humans (2, 12, 13, 17, 23) emphasis is given to the particularities of *V. fluvialis*. This species was located in 10 different sites of the Bay (33,3%) and

Table 3 - Serovars of *V. parahaemolyticus* isolated from the oysters and water of Sepetiba Bay, RJ.

Symbols: * = Not determined

Serovars O:K	Oysters	Water	Total
0 1:K32	1	-	1
0 1:K33	-	1	1
0 2:K28	1	1	2
0 3:K29	-	1	1
0 3:K*	1	-	1
0 4:K13	-	1	1
0 4:K*	1	-	1
0 5:K61	1	-	1
0 5:K*	-	1	1
0 8:K20	2	-	2
011:K15	-	1	1
Untypable	1	1	2
Total	8	7	15

its isolates originated primordially from oysters. On the other hand *V. damsela* and *V. vulnificus*, were detected only in the sea water in a station close to the shore presenting characteristics of an estuary (Figure 1).

Other considerations are limited to the evaluation of the efficiency of the culture media in which all enrichment processes have shown satisfactory results for *V. fluvialis*. However this fact was not confirmed for *V. vulnificus*, *V. damsela* and *V. harveyi*. Taking into consideration the scanty number of isolates obtained for these species thus making any analysis out of point.

The information obtained in this research evidence the complexity and multiplicity of the known and unknown species of the genus *Vibrio* present in the marine ecosystem. The medical prominence of some new representatives of these species are being emphasized in papers recently (2, 15).

In what concerns methodology it is advocated that the recognition of these microorganisms depends directly on the adoption of more inclusive bacteriologic schemes. Stress is given to the efficiency shown by the alkaline peptone water with 1% of NaCl associated with the nutrient broth with addition of 2% of NaCl (with or without 200mg% of eosin Y) besides streaked directly on to TCBS agar after the enrichment procedure.

Acknowledgements

We are indebted to Dr. R. Sakazaki, Chief of Enterobacteriology Laboratories of National Institute of Health, Tokyo, Japan for characterizing the strains of *V. parahaemolyticus* and to Mr. Evaldo Soares da Silva for technical assistance.

References

1. American Public Health Association - Recommend procedures for the examination of seawater and shellfish. 4.ed. Washington, D.C., American Public Health Association, 1976.
2. Blake, P.A.; Weaver, R.E. & Hollis, D.C. - Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. Ann. Rev. Microbiol., 34:341-367, 1980.
3. Colwell, R.R. & Liston, J. - Microbiology of shellfish: bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) Appl. Microbiol., 8:104-109, 1960.
4. Davis, J.W. & Sizemore, K. - Incidence of *Vibrio* species associated with blue crabs (*Callinectes sapidus*) collected from Galveston Bay, Texas. Appl. Environ. Microbiol., 43:1092-1097, 1982.
5. De Paola, A. - *Vibrio cholerae* in marine foods and environmental waters: a literature review. J. Food Sci., 46:66-70, 1981.
6. Eiroa, M.N.V. - Aspectos microbiológicos relacionados a conservação e ao consumo de pescado. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim., 54:9-37, 1980.
7. Fishbein, M. & Wentz, B. - *Vibrio parahaemolyticus* methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. J. Milk Food Technol., 36:118-123, 1973.
8. Gelli, D.S., Tachibana, T. & Sakuma, H. - Ocorrência de *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* e de bactérias mesófilas em ostras. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 39:61-66, 1979.
9. Hofer, E. - Métodos de isolamento e identificação de *Vibrio cholerae*. Monografia Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), 1974.
10. Hofer, E. & Silva, C.H.D. - Isolamento e identificação de *Vibrio parahaemolyticus* de material de peixes de origem marinha. Anais do V Congr. Bras. Microbiol., Rio de Janeiro, Universidade Gama Filho, 1974.
11. Hofer, E. & Silva, C.H.D. - An evaluation of the efficiency of enrichment media in the isolation process for *Vibrio parahaemolyticus*. Zbl. Bakt. Hyg. A, 256:456-465, 1984.
12. Hughes, J.M.; Dannie, G.H.; Gangarosa, E.J. & Weaver, R.E. - Non-cholera vibrio infections in the United States. Ann. Int. Med., 88:602-606, 1978.
13. Huq, M.I.; Alam, A.K.M.J.; Brenner, D.J. & Morris, G.K. - Isolation of *Vibrio* -

- like group, EF-6, from patients with diarrhoea. J. Clin. Microbiol., 11:621-624, 1980.
- 14. Kaneko, T. & Colwell, R.R. - Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* and related organisms in the Atlantic Ocean off South Carolina and Georgia. Appl. Microbiol., 28:1009-1017, 1974.
 - 15. Kaysner, C.H. - Incidence of *Vibrio alginolyticus* and bacteria of sanitary significance in the Bering Sea. Appl. Environ. Microbiol., 41:1279-1282, 1981.
 - 16. Leitão, M.F.F.; Arima, H.K. & Kai, M. - *Vibrio parahaemolyticus* no ambiente marinho do Estado de São Paulo: incidência em peixes, moluscos e crustáceos. Col. Inst. Tecnol. Alim., 7:181-190, 1976.
 - 17. Morris, J.G.; Wilson, R.; Hollis, D.G.; Weaver, R.E.; Miller, H.G.; Tacket, C.O.; Hickman, F.W., & Blake, P.A. - Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae*. Lancet, 8284:1294-1297, 1982.
 - 18. Murchelano, R.A., & Brow. C. - Bacteriological study of the natural flora of the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. J. Invertebrate Pathol., 11:519-520, 1968.
 - 19. Odum, E.P. - Ecologia. São Paulo, EDUSP, 1969.
 - 20. Sakazaki, R. - *Vibrio parahaemolyticus* isolation and identification. Tokyo, Nihon Eiyo Kagaku, 1965.
 - 21. Sakazaki, R.; Tamura, K.; Prescott, L.M.; Denciz, Z.; Sanyal, S.C. & Sinha, R. - Bacteriological examination of diarrhoeal stools in Calcutta. Ind. J. Med. Res., 59:1025-1034, 1971.
 - 22. Shewan, J.M. - Food poisoning caused by fish, fishery products: fish as food. New York, Academic Press, Vol. 1, 1962.
 - 23. West, P.A. & Colwell, R.R. - Identification and classification on Vibrionaceae: an overview. In: - Vibrios in the environment. New York, John Wiley & Sons, c.20, p.285-363, 1984.
 - 24. World Health Organization - Cholera and other *Vibrio* associated diarrhoeas: report of a sub-group of the Scientific Working Group on Epidemiology and Etiology. Geneva, 24-27 September 1979, 1980.

DETEÇÃO DE VERO CITOTOXINA (VT) EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE BEZERROS COM DIARRÉIA

Tomomasa Yano
 Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro
 Marcina Garcia
 & Antonio Fernando Pestana de Castro
 Deptº de Microbiologia e Imunologia
 Instituto de Biologia Unicamp
 Cidade Universitária Barão Geraldo
 13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

Entre 104 amostras de *Escherichia coli* isoladas de bezerros com diarréia, 70 produziram citotoxina ativa em células VERO. Nenhuma das amostras produziu enterotoxina termoestável (STa) detectável pelo teste do camundongo recém-nascido ou enterotoxina termolábil ensaiada pelo teste de imunohemólise radial. Os autores fazem considerações sobre o papel que essa citotoxina pode desempenhar na etiologia da diarréia neonatal em bezerros.

Summary

Detection of VERO cytotoxin (VT) among strains of Escherichia coli isolated from calves with diarrhea

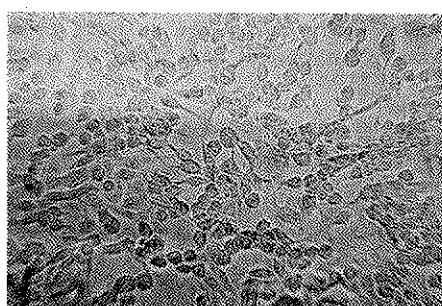
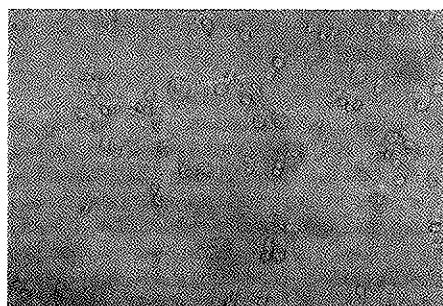
Out of 104 *E. coli* strains isolated from calves with diarrhea to produced VERO cytotoxin (VT). All strains produced neither thermostable (STa) enterotoxin as assayed by the infant mouse test nor thermolabile (LT) enterotoxin as detected by the single radial immunehemolysis test. The authors comment the role that this cytotoxin may play in the aetiology of neonatal diarrhea in calves.

As amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas (ETEC), isoladas do homem e suínos, podem produzir: a. uma enterotoxina termolábil (LT) (Donta, S.T. & col., Science, 183:334-336, 1974; Castro, A.F.P. de & col., J. Clin. Microbiol., 12: 714-717, 1980) e pelo menos duas variedades de enterotoxina termoestável, denominadas STa e STb. A STa é ativa no teste do camundongo recém-nascido (Dean, A.G. & col., J. Clin. Microbiol., 10:786-796, 1979) e a STb só é ativa biologicamente no teste de alça ligada de intestino de porco (Castro, A.F.P. de & col., Vet. Rec., 115:518-519, 1984). Além destas toxinas, certas amostras de *E. coli* podem produzir uma citotoxina ativa em células VERO e por isso denominada "VERO cytotoxin" ou simplesmente "VERO toxin" (VT) (Konowalchuk, J. & col., Infect. & Immun., 18:775-779, 1977; Kashiwazaki, M., Natl. Inst. Animal Health Q., 20:116-117, 1980; Gonzales, E.A. & Blanco, J., FEMS Lett., 26:127-130, 1985). Recentemente, o interesse pelo estudo da VT aumentou porque existem indícios de que o princípio ativo da doença do endema (PDE) seria bastante semelhante, se não idêntico, à VT (Smith, H.W. & col., J. Gen. Microbiol., 129: 3121-3137, 1983). No que concerne às amostras de origem humana, observou-se que aquelas produtoras de VT e pertencentes ao sorogrupo 0157 parecem estar envolvidas em casos de enterite hemorrágica (Ryley, L.W. & col., New Eng. J. Med., 308:681-685, 1983). Além disso, uma amostra de *E. coli* (H30), do sorogrupo 026, isolada de casos de diarréia infantil na Inglaterra, durante muitos anos, produz grandes quantidades de VT,

sendo mesmo tomada como amostra padrão no estudo dessa toxina. Em relação a bovinos, apenas amostras produtoras de STa têm sido relatadas como importantes na etiologia da diarréia neonatal (Guinée, P.A.M. & col., Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., 243:245-257, 1979).

Por outro lado, a produção de LT, por amostras isoladas de bovinos é negada por vários autores (Myers, L.L. & col., Amer. J. Vet. Res., 45:1544-1548, 1984). Nossa propósito, na presente pesquisa, foi, trabalhando com 104 amostras de *E. coli* isoladas de bezerros com diarréia, da região de Campo Grande, MS, averiguar a produção de VT. Todas essas amostras foram negativas para STa (Dean, A.G. & col., J. Clin. Microbiol., 10:786-796, 1979) e para LT (Yano, T. & col., Med. Microbiol. Immun., 171:171-178, 1983). Para a pesquisa de VT, as amostras foram cultivadas em "Trypticase Soy Broth" (TSB) (Difco Lab.) a 37°C, por 24h, sob agitação (150rpm). As culturas foram então centrifugadas e os sobrenadantes filtrados em filtro Millipore (0.22μ). O cultivo das células VERO foi feito em meio de RPMI 1640 (Difco, Lab.) com 10% de soro fetal bovino (Microbiologica, Rio de Janeiro, Brasil), colocando-se em cada orifício 1.5 x 10⁴ células. Após incubação em atmosfera de CO₂ (5%), a 37°C por 24h, substituiu-se o meio original por meio sem soro, aplicando-se, em seguida, a cada orifício da placa, 20μl de cada sobrenadante de cultura em estudo. As placas foram reincubadas e os resultados avaliados após 48h, obedecendo-se aos critérios de Konowalchuk & col., já citados. Como controle positivo da reação usou-se sobrenadante da amostra de *E. coli* H30 (cedida gentilmente por Konowalchuk) e como controle negativo o sobrenadante da cultura de *E. coli* K12, cedida por L.R. Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, São Paulo SP, Brasil). Das 104 amostras estudadas, 70 (67,3%) foram positivas para a produção de VT (Figura 1). O resultado do controle negativo é visto na Figura 2. Encontrou-se na literatura algumas citações da ocorrência de produção de VT por amostras de origem animal, porém, em relação a bovinos os trabalhos são escassos ou o número de amostras estudadas foi reduzido (Kashiwazaki, M. & col., Natl. Inst. Animal Health Q., 20:116-117, 1980; Sherwood, D. & col., Vet. Rec., 116:217-218, 1985).

Figura 1 - a. Efeito em células VERO produzido pela linhagem 55 de *E. coli* (STa⁻, LT⁻); b. Controle negativo (*E. coli* K12)



No que tange as relações entre as VTs de diferentes origens, os dados são variáveis. Segundo Konowalchuk & col. (Infect. Immun., 18:171-178, 1978), a VT de origem humana diferiria da produzida pelas amostras de origem suína ou o PDE. Já outros autores não conseguiram, por exemplo, detectar diferenças entre as VTs produzidas por amostras de origem bovina e humana (H30) (Kashiwazaki, M. & col., Natl. Inst. Animal Health Q., 21:68-72, 1981). Do ponto de vista epidemiológico os dados existentes na literatura também são diferentes. De acordo com da Silva, M. & col. (Rev. Microbiol., 14:161-162, 1983) nenhuma das 186 amostras de origem humana, pertencentes aos grupos de *E. coli* enteropatogênicas clássicas, por eles examinados, produziu VT. Por outro lado, Marques, L.R.M. (comunicação pessoal), em

estudo realizado nos Estados Unidos, verificou a produção de VT, com maior frequência em amostras do sorogrupo 026, fato também confirmado por outros autores (Scotland, S.M. & col., FEMS Microbiology Letters, 7:15-17, 1980). Qualquer que seja a origem das amostras consideradas, os trabalhos citados são concordantes de que o verdadeiro papel desempenhado pela VT na etiopatogenia da diarréia, precisa ser melhor investigado. Na presente série, a elevada incidência de VT, ou seja 63,7% dentre 104 amostras de *E. coli* ST^a- e LT^a, sugere a possibilidade de que esta citotoxina poderia, eventualmente, ter algum envolvimento em casos de diarréia em bezerros. Essa hipótese será comprovada principalmente se se confirmarem, em estudos posteriores, que nestas amostras, em especial nas mais citotoxigênicas, além do efeito VT, existe uma ação enterotóxica, à semelhança do que ocorre com a amostra de *E. coli* H30, cuja VT tinha grande semelhança biológica com a toxina produzida por amostras de *Shigella dysenteriae* (O' Brien, A.D. & col., Lancet, 11:573, 1983), esta sabidamente dotada de efeito citotóxico, enterotóxico e neurotóxico (Brown, J.E. & col., Infect. Immun., 36:996-1005, 1982).

Agradecimentos

Trabalho subsidiado por projetos da FINEP e da FAPESP.
Os autores agradecem aos pesquisadores do Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Corte, da EMBRAPA, em Campo Grande, pelo envio das amostras de *E. coli*, o que propiciou a realização do presente trabalho.

INFERTILIDADE E ABORTAMENTOS EM REBANHO BOVINO CAUSADOS POR CAMPYLOBACTER FETUS SUBSP. FETUS: PROFILAXIA E TRATAMENTO

Waldyr Giorgi
 Margareth Élide Genovez
 Eliana Scarcelli (Estagiária)
 & Andrea Barbosa Boanova Picone (Estagiária)

Instituto Biológico
 Seção de Doenças de Bovinos
 Caixa Postal 7119
 01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Campylobacter fetus subsp. *fetus* foi isolado do conteúdo estomacal de um feto abortado, de lavado e "swabs" prepuciais de um touro provenientes de um rebanho que apresentava elevados índices de infertilidade, repetições de cio, várias coberturas para fertilização e casos de abortamento. Instituiu-se antibioticoterapia tópica e sistêmica, recomendando-se repouso sexual do macho e das fêmeas por 30 dias. Após esse período foram feitos exames bacteriológicos de controle que se mostraram negativos, não havendo ocorrência de novos abortamentos. Os autores discutem o papel do *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* na infertilidade de bovinos.

Summary

Infertility and abortions in cattle due to Campylobacter fetus subsp. fetus: control procedures and treatment

Campylobacter fetus subsp. *fetus* was isolated from the aborted fetal fluids, the prepucial washing and prepucial swab, of a dairy cattle with clinical history of infertility and abortions. Therapeutic and prophylactic measures were recommended. The controlling bacteriological tests were negative and new abortions never happened. The authors discussed the role played by the *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* as a cause of the cattle infertility.

Introdução

A campilobacteriose genital bovina é uma doença infecciosa causada por *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, outrora denominado *Vibrio fetus* (11). Nas fêmeas infectadas, a bactéria causa problemas reprodutivos, como infertilidade temporária, com repetições de cios e abortamentos ocasionais. O macho comporta-se como portador assintomático, uma vez que o microrganismo não causa nenhuma alteração patológica e não interfere na sua capacidade reprodutiva (11, 18).

Existe outra forma de campilobacteriose, distinta da venérea, atribuída ao *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, anteriormente *intestinalis* (11), habitante do trato intestinal de bovinos, ovinos, pássaros e humanos, tendo sido encontrado também na vesícula biliar de bovinos (18). Geralmente, comporta-se como microrganismo comensal, podendo, eventualmente, migrar por via sanguínea e alojar-se nos placentomas, ocasionando reação inflamatória que pode culminar com o abortamento entre o 4º e 6º mês de gestação (10, 18).

No Brasil foram realizadas pesquisas sobre a ocorrência da campilobacteriose bovina, evidenciadas pelo isolamento do microrganismo de fetos abortados (5, 9, 15), de lavados prepuciais (9, 15) e pela prova de mucoaglutinação em fêmeas (14).

O presente trabalho relata a ocorrência de campilobacteriose genital bovina, causada pelo *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, promovendo infertilidade e abortamentos num rebanho bovino.

Material e Métodos

De uma propriedade leiteira localizada na cidade de Jacareí, Estado de São Paulo, cujo rebanho era composto de 35 fêmeas e um touro, cujas fêmeas apresentavam sinais de infertilidade e vários casos de abortamentos, foi coletado um feto abortado ao redor do 6º mês de gestação e posteriormente muco prepucial do touro com aproximadamente 12 anos de idade, em função reprodutiva, para pesquisa de bactérias causadoras de abortamento como *Campylobacter*, *Brucella*, *Leptospira* e outras (2, 16, 18).

Aliquotas do conteúdo estomacal foram semeadas em placas contendo ágar *Brucella* (Difco) com 10% de sangue desfibrinado de carneiro, com e sem acréscimo de uma solução de antibióticos composta por bacitracina 0,3g/l, polimixina B 0,0012g/l, actidione 0,02g/l e novobiocina 0,005g/l (6,11).

Parte das placas foi incubada a 37°C, por 72 horas, sob condição atmosférica de microaerofilia, gerada pela técnica da vela, sendo a outra parte colocada simplesmente em aerobiose em estufa a 37°C. Uma amostra do conteúdo estomacal foi também semeada em tubos contendo meio de Fletcher (Difco) acrescido de 10% de soro inativado de coelho, que foi mantido sob aerobiose a 28°C, por 10 dias para pesquisa de *Leptospira* sp. (16).

Foram incluídas também placas com ágar H.H.Teague (eosina azul de metíleno) para pesquisa de enterobactérias, eventualmente causadoras de abortamento (8).

Amostras do muco prepucial do touro foram obtidas através do lavado e "swab" (6, 18). O lavado foi obtido mediante a introdução de 30ml de solução salina tamponada estéril na cavidade prepucial e após massagem do prepúcio, parte do líquido recolhido (3ml) foi introduzido em frascos contendo 5ml de Transport Medium Stuart (Difco) acrescido de 0,2% de pó de carvão vegetal ativado. O "swab" foi introduzido profundamente na cavidade prepucial, efetuando-se movimentos circulares que permitiam tanto a absorção do muco quanto a raspagem da mucosa. Após a coleta o "swab" foi embebido no mesmo meio de transporte. Os materiais provenientes do touro foram processados da mesma forma que a descrita anteriormente para o conteúdo estomacal, e os microrganismos isolados submetidos a estudos bioquímicos para identificação. Foi sugerido, também, tratamento dos animais à base de lavagens antissépticas e com antibióticos.

Resultados

No ágar *Brucella*, sem e com solução de antibióticos semeado com o conteúdo estomacal do feto abortado, verificou-se a presença de colônias pequenas com cerca de 1mm de diâmetro, convexas, brilhantes de cor branca-acinzentada e não hemolíticas. Através do exame bacterioscópico observaram-se bastonetes Gram-negativos em forma de vírgula, asa de gaivota e "S" que caracterizam o gênero *Campylobacter*.

Do muco prepucial coletado através de "swab" e semeado em ágar *Brucella* contendo a solução de antibióticos, foram observadas colônias semelhantes às descritas anteriormente, cujo exame bacterioscópico mostrou morfologia também compatível com o gênero *Campylobacter*.

Ambas as culturas, após serem semeadas em tubos contendo meio de tioglicolato (Merck), adicionado de 0,16% de Bacto Ágar (Difco) foram submetidas as provas bioquímicas (11, 18). Tais culturas mostraram ser catalase positivas, produtoras de H_2S pelo enegrecimento da fita de acetato de chumbo e tolerantes a glicina nas concentrações de 1 e 1,5%.

Através destes resultados pode-se constatar que os microrganismos isolados tanto do touro quanto do feto tratavam-se de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*.

Do conteúdo estomacal do feto abortado não foi verificado crescimento de microrganismos patogênicos nos meios de ágar H.H.Teague e Fletcher. Do lavado prepucial e "swab" houve o crescimento de bactérias contaminantes, próprias da flora prepucial frequentemente encontrada em touros.

Foram propostas medidas profiláticas e terapêuticas para a campilobacteriose (18): o tratamento local indicado para o touro foi de 5g de estreptomicina e 5.000UI de penicilina dissolvidas em 20ml de uma solução aquosa de açúcar comum 30% P/V, aquecida e introduzida na cavidade prepucial efetuando-se massagem, instituindo-se quatro tratamentos em dias alternados. Como tratamento parenteral utilizou-se uma solução aquosa 50% de 22mg/kg de dihidroestreptomicina, repetida três vezes com intervalo de 48 horas. O touro permaneceu em repouso sexual pelo prazo de 30 dias.

Nas fêmeas foram feitas infusões intrauterinas à base de mucolítico associado com os antibióticos descritos acima, assim como, repouso sexual por um período também de 30 dias.

Após tratamento realizaram-se exames de controle no touro que se mostrou bacteriologicamente negativo, não havendo posteriormente, ocorrência de novos abortamentos.

Discussão

O isolamento do *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* do muco prepucial de um touro e de um feto abortado, provenientes do mesmo rebanho que apresentava problemas reprodutivos, demonstra a complexidade de fatores que envolvem a campilobacteriose bovina.

A subespécie *fetus* distinguida por Florent (7) da subespécie *venerealis* tem sido citada (7, 10, 18, 20) como causadora de aborto esporádico, não relacionada à infertilidade e sendo adquirida por ingestão e, portanto, de transmissão não venérea. No entanto, não tem sido facilmente explicada sua frequente ocorrência em amostras prepuciais de touros pertencentes a rebanhos com problemas reprodutivos (3).

A probabilidade de infecção genital por via externa, isto é, por ingestão ou por contaminação fecal dos órgãos genitais, pode ser aceita uma vez que as condições de manejo permitam tal fato.

Florent, em 1959 (7), observou elevada proporção de coproculturas positivas para *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* em fêmeas vítimas de abortamentos esporádicos, o que não se verificou em fêmeas com campilobacteriose venéreas.

Por outro lado, a permanência da subespécie *fetus* no trato genital pode atingir até 120 dias na fêmea e 60 dias no macho (1), o que provavelmente representa tempo suficiente para a disseminação da doença num rebanho.

A instilação de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* no trato genital de fêmeas virgens pode promover infecção branda, porém persistente com o aparecimento de salpingite, endometrite, cervicite e vaginite, inclusive com a ocorrência de alteração do sorotipo da estirpe infectante (17). Estes fatos demonstram que as características antigênicas e bioquímicas distintas entre as duas subespécies são pouco precisas, e podem ser evidenciadas pela possibilidade de certas estirpes apresentarem comportamento bioquímico compatível com estirpes intestinais, mas com patogenicidade relacionada às estirpes venéreas, inclusive com a ocorrência de infertilidade (17).

Alterações na estrutura do antígeno somático e dos抗ígenos de superfície foram demonstradas em culturas de *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* na presença de anticorpo específico (12, 13). Uma situação análoga a este fenômeno poderia estar ocorrendo, na qual anticorpos específicos secretados na região genital para uma determinada estirpe infectante sejam responsáveis pelas variações antigênicas (4).

Alterações desse tipo, assim como, aquelas mediadas por plasmídeos ou ainda referentes à seleção de mutantes, têm sido descritas em outros microrganismos Gram-negativos (19).

Simples provas bioquímicas podem ser responsáveis pela evidenciação de tais fenômenos como, por exemplo, a transformação de estirpes "glicina sensíveis" em "glicina resistentes" (17).

Estudos no sentido de elucidar a importância da variedade intestinal obtida a partir de amostras do trato genital seria de grande importância no conhecimento da campilobacteriose.

Referências Bibliográficas

1. Agumbah, J.O. & Ogan, J.S. - Genital tropism and coital transmission of *Campylobacter fetus* subsp. *intestinalis*. Brit. Vet. J., 135:83-91, 1979.
2. Alton, G.G.L. & Jones, L.M. - Laboratory techniques in brucellosis. WHO Monogr. Ser., 55:9-26, 1967.
3. Cipolla, A.L.; Palladino, M.R.; Campero, C.M.; Zamora, A.S. & Casaro, A.P. - Aislamiento y tipificación de *Campylobacter* en toros enviados a faena. Vet. Arg., 1:353-360, 1984.
4. Corbeil, L.B.; Corbeil, R.R. & Winter, A.J. - Bovine venereal vibriosis: activity of inflammatory cells in protective immunity. Am. J. Vet. Res., 36:403-406, 1975.
5. D'Apice, M. - Ocorrência de aborto bovino no Estado de São Paulo devido ao *Vibrio fetus*. Biológico, 22:15-18, 1956.
6. Duffy, J.H. - Diagnosis of vibriosis in the bull. Austr. Vet. J., 43:433-437, 1967.
7. Florent, A. - Les deux vibriosis génitales: la vibriose due à *V. fetus* *venerealis* et la vibriose d'origine intestinale due à *V. fetus* *intestinalis*. Meded. Veeartsenysch. Ryksuniv. Gent., 3:1-60, 1959.
8. Giorgi, W.; Lobão, A.O.; Santa Rosa, C.A. & França, E. - Abortamentos em bovinos: isolamento de *Salmonella dublin*. Arq. Inst. Biol., 35:185-188, 1968.
9. Giorgi, W.; Pestana de Castro, A.F. & Oliveira Jr., B.S. - Typification of *Vibrio fetus* isolated from bovine in the state of São Paulo. Arq. Inst. Biol., 38:31-36, 1971.
10. Hoffer, M.A. - Bovine campilobacteriose: a review. Can. Vet. J., 22:327-330, 1981.
11. Holt, J.C. & Krilg, N.R., eds. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, p.111-118, 1984.
12. Mitscherlich, E. von & Heider, R. - Changes in the O-antigen type of *Vibrio fetus* strains. Zentralbl. Vet. Med., 15b:486-493, 1968.
13. Ogg, J.E. & Chang, W. - Phage conversion of serotypes in *Vibrio fetus*. Am. J. Vet. Res., 33:1023-1029, 1972.
14. Pestana de Castro, A.F.; Giorgi, W.; Aoki, D. & Henrique, J. - Pesquisa de aglutininas anti-*Vibrio fetus* em muços vaginalis de rebanhos bovinos de São Paulo, Minas Gerais e Paraná. Biológico, 37:115-118, 1971.
15. Pestana de Castro, A.F.; Santa Rosa, C.A.; Troise, C. & Berttet, L.E.A. - Vibriose bovina no Estado de São Paulo: isolamento de *Vibrio fetus* de um feto bovino e de um touro. Arq. Inst. Biol., 30:175-179, 1963.
16. Santa Rosa, C.A. - Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. Rev. Microbiol., 1:97-109, 1970.
17. Shurig, G.D.; Hall, C.E.; Burda, K.; Corbeil, L.B.; Duncan, J.R. & Winter, A.J. - Persistent genital tract infection with *Vibrio fetus* *intestinalis* associated with serotypes alteration of the infecting strain. Am. J. Vet. Res., 34:1399-1403, 1973.
18. Stoessel, F. - Las enfermedades venereas de los bovinos. Espanha, Acribia, 1982.
19. Uetake, H.; Nakagawa, T. & Akisa, T. - The relationship of bacteriophage to antigenic changes in group E Salmonellas. J. Bact., 69:571-579, 1955.
20. Vanderplassche, M.; Florent, A.; Bouters, R.; Huysman, E.B. & Keyser, P. - The pathogenesis, epidemiology and treatment of *Vibrio fetus* infection in cattle. Compt. Rend. Rech. Aci. Ind. Agric., 29:1-90, 1963.

**CRYPTOSPORIDIUM CURYI SP.N. IN THE FECES OF CATS IN THE CITY OF
SÃO PAULO, BRAZIL**

Saemi Ogassawara

Sérgio Benassi

Deptº de Medicina Veterinária Preventiva
e Saúde Animal

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP, Brasil

Carlos Eduardo Larsson
& Mitika Kurabayashi Hagiwara

Deptº de Clínica
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP

Summary

For the first time in Brazil a new type of oocysts of coccidia was observed in cats feces. Parasitological examinations carried out in the feces of 150 cats in the city of São Paulo, detected 8 (5,3%) animals shedding sporulated oocysts of the coccidia. The oocysts were spherical, $25,1 - 34,5 \times 31,4 - 37,7$ (mean $30,32,3 \times 31,1 \mu\text{m}$), with a 2-layered, smooth, colorless wall with a residuum composed of scattered granules or sometimes composed of condensed mass. They contained four naked elongated fusiform sporozoites, $15,7 - 22,0 \times 3,1 - 3,8$ (mean $25,17,3 \times 3,1 \mu\text{m}$). The Giemsa-stained sporozoites have a small round and black structure at near one end (that seemed to be the nucleus) and also some clear globules. These oocysts upon floatation method with saturated sugar solution appeared deformed. Hypothesis on the identity of this coccidia are presented. Based on actual knowledge on coccidia we placed under the genus *Cryptosporidium* and the species *C. curyi* sp.n.

Resumo

Cryptosporidium curyi sp.n. nas fezes de gatos na cidade de São Paulo, Brasil

Pela primeira vez no Brasil, um novo tipo de oocistos de coccidia foi observado nas fezes de gatos. Exames parasitológicos realizados nas fezes de 150 gatos, na cidade de São Paulo, detectaram 8 (5,3%) animais eliminando oocistos esporulados da coccidia. Os oocistos eram esféricos, $25,1 - 34,5 \times 31,4 - 37,7$ (média $30,32,3 \times 31,1 \mu\text{m}$), com dupla membrana, parede lisa e incolor, contendo um corpo residual composto de granulos esparsos ou algumas vezes composto de uma massa compacta. Eles continham quatro esporozoítas alongados e fusiformes, $15,7 - 22,0 \times 3,1 - 3,8$ (média $25,17,3 \times 3,1 \mu\text{m}$). Os esporozoítas corados pelo Giemsa apresentaram uma estrutura pequena, arredondada e escura em uma das extremidades (que pareceu ser o núcleo) e também alguns globulos claros. Esses oocistos submetidos ao método de flutuação com solução saturada de açúcar apresentaram-se deformados. Hipóteses sobre a

identidade dessa coccidia são apresentadas. Baseando-se nos conhecimentos atuais sobre coccidias colocou-se no gênero *Cryptosporidium* e espécie *C. curyi* sp.n.

Introduction

A few years ago the only genera of coccidia thought to occur in cats were *Isospora*, *Eimeria*, and *Cryptosporidium*. At present it is known that *Toxoplasma*, *Sarcocystis*, and *Besnoitia* are all coccidia with oocysts similar to those of *Isospora* and that most of the organisms given the name *Cryptosporidium* are actually *Sarcocysts* (3). The oocysts of them are sporulated (*Sarcocystis*, and *Cryptosporidium*), or non-sporulated (*Isospora*, *Toxoplasma*, *Hammondia*, and *Besnoitia*), when excreted in the feces.

These are all the coccidia known in cats are present (2, 3, 5, 6).

This paper reports for the first time a new type of oocysts of coccidia observed in the feces of domestic cats in the city of São Paulo, Brazil.

Material and Methods

Parasitological examinations were carried out in the feces of 150 cats from different areas of city of São Paulo.

Techniques - Cats feces were examined by floatation and centrifugation in water-ether methods as described by Ogassawara & col. (4).

The sporozoites were stained by Giemsa's staining method after mechanical rupture of the oocysts.

Results

Besides eggs and larvae of helminths and oocysts of already known protozoa we detected 8 (5,3%) animals shedding different kind of oocysts. The age of the positive cats was from six months to six year-old.

Oocyst structure - The oocysts were sporulated when excreted in the feces and they were spherical, $25,1 - 34,5 \times 31,4 - 37,7$ (mean₃₀, $32,3 \times 31,1 \mu\text{m}$, with a 2-layered, smooth, colorless wall with a residuum composed of scattered granules or sometimes composed of condensed mass. They contained four naked elongated fusiform sporozoites, $15,7 - 22,0 \times 3,1 - 3,8$ (mean₂₅, $17,3 \times 3,1 \mu\text{m}$ (Figure 1). The Giemsa-stained sporozoites have a small round and black structure at near end (that seemed to be the nucleus), and also some clear globules (Figure 2).

The oocysts examined by floatation method using saturated sugar solution (d 1.203) frequently appeared deformed. Nevertheless, when they were suspended in water resumed their original form - oocysts with a 2-layered smooth wall.

Discussion

Actually, three genus of coccidia are known passing sporulated oocysts in the feces - *Cryptosporidium*, *Sarcocystis*, and *Frenkelia*, the later in the feces of buzzards - *Buteo buteo*. *Cryptosporidium* oocysts were indentified in the feces very recently (1, 7).

The oocysts of the coccidia detected are very similar to *Cryptosporidium muris* Tyzzer, 1907 on structural basis, but the former ($32,3 \times 31,1 \mu\text{m}$) are six to seven times bigger than the later ($5-6 \mu\text{m}$).

During our study we tried to infect cats with these oocysts but failed. So we do not know if this parasite need some intermediate host or not.

Figure 1 - Sporulated oocysts in water suspension. 400X

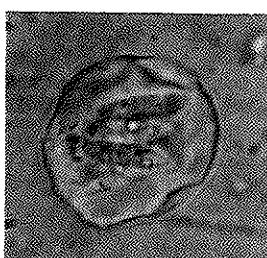
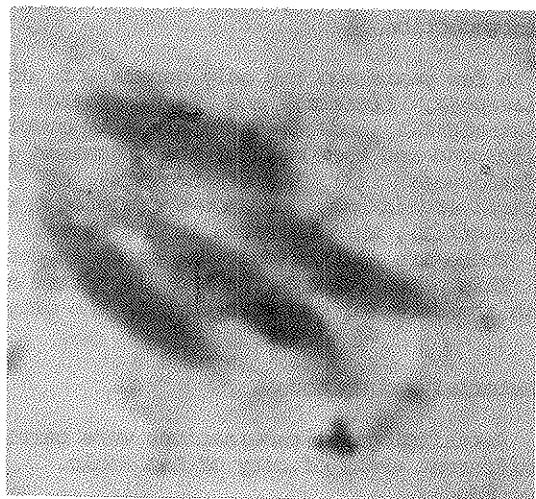


Figure 2 - Giemsa-stained sporozoites with a small round and black corpuscles and some clear globules. A compact mass of a residuum is seen. 1000X



All coccidia are not monoxenous as it was supposed but some of them are strictly or optionally heteroxenous.

Cryptosporidium is known to be monoxenous with the whole developmental stages of the parasite mainly in the intestine. *Sarcocystis* are heteroxenous - the host of the sexual stages is a predator and that of the sexual stages is a prey animal.

Isospora on the other hand, is monoxenous or optionally heteroxenous.

The oocysts of the coccidia found do not fit any other one known at present. The following hypothesis about this coccidia can be brought forward:

1. The oocyst could be a free sporocysts of an unknown *Isospora*;
2. The oocyst could be *Sarcocystis* species not reported yet;
3. The oocyst could be an accidental ingestion of coccidia of another animals such as small mammals, reptiles, or birds. Nevertheless, the third hypothesis is the weaker because some of the cats were passing oocysts for more than a week after the first examination.

In view of the actual knowledge on coccidia we believe that the identified oocysts belong to a new species of the genus *Cryptosporidium* or another genus of the family *Cryptosporidiidae* (at now only one genus). The oocyst is placed under the genus *Cryptosporidium* and the species named *C. curyi* sp.n (in honor of the eminent Prof. Dr. Rolando Cury, ex-professor of the School of Veterinary Medicine of University of São Paulo).

Acknowledgement

We are very grateful to Dr. Kiyoshi Tsunoda, ex-Chief of Parasitology Laboratory of National Institute of Animal Health, Tsukuba-Ibaraki, Japan, for his advice and opinion.

References

1. Anderson, B.C. - Patterns of shedding of cryptosporidial oocysts in Idaho calves. J.A.V.M.A., 178:982-984, 1981.
2. Levine, N.D. - Taxonomy and life cycle of coccidia. In: - Long, P.L. - The biology of the coccidia. USA, Univ. Park Press, p.1-33, 1982.
3. Levine, N.D. & Ivens, V. - The coccidian parasites (Protozoa, Apicomplexa) of

- carnivores. USA, Univ. Illinois Press, Illinois Biological Monographs, 51, 1981.
4. Ogassawara, S.; Benassi, S.; Hagiwara, M.K. & Larsson, C.E. - *Icospora* spp.: estudo sobre a ocorrência na espécie felina, na cidade de São Paulo. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 11:126-130, 1980.
 5. Pellérdy, L.P. - Coccidia and coccidiosis. Budapest, Akadémiai Nyomda, 1974.
 6. Tadros, W. & Laarman, J.J. - Current concepts on the biology, evolution and taxonomy of tissue cyst-forming eimeriid coccidia. Adv. Parasitol., 20:293-468, 1982.
 7. Tzipori, S. - Cryptosporidiosis in animals and humans. Microbiol. Rev., 47:84-96, 1983.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS: PESQUISA DE PORTADORES BOVINOS EM LACTAÇÃO E ANTIBIOPRIMA DAS CEPAS ISOLADAS

Maria Lúcia Cavalieri de Araújo

Deptº de Microbiologia

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal UNESP

Campus de Jaboticabal
14870 Jaboticabal SP, Brasil

Izabel Yoko Ito

Deptº de Ciências de Saúde

Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto USP
Campus de Ribeirão Preto
14100 Ribeirão Preto SP

Maria Emilia Bodini Santiago

Marta Schiavone Cardoso
& Eliane Cristina da Cunha

Deptº de Microbiologia

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de
Jaboticabal UNESP

Resumo

É discutida a importância da pesquisa de portadores de *S. aureus* em bovinos, particularmente fêmeas em lactação. As cepas obtidas de diferentes nichos apresentaram-se positivas para *S. aureus*, considerando-se o teste de coagulase em tubo nas porcentagens de 4,0% para as isoladas das fossas nasais; 30,90% para as do úbere antes do teste da caneca telada e 47,62% para as do úbere depois do teste. Resultados do antibiograma revelaram altos níveis de resistência principalmente com relação a estreptomicina e a penicilina.

Summary

Staphylococcus aureus: search of bovine hosts during milking period and antibiogram of isolated strains

Bovine hosts of *S. aureus* importance are discussed, particularly in females during the milking period. The isolated strains of the various niches showed to be positive for *S. aureus* considering the coagulase test tube assay in the percentages of 4.0% for the isolates from nostrils; 30,9% for the isolates from the udders before the test and 47,62%, for the isolates from the udders after the test. Results from antibiograms showed high levels of resistance mainly for streptomycin and penicillin.

Introdução

A mastite bovina ocasionada pelo *S. aureus* é frequente em nosso meio ambiente, sendo uma afecção que acarreta prejuízos de ordem econômica ligados à diminuição ou

perda total da lactação sendo também uma enfermidade crônica e de caráter contagioso.

Frequentemente, as cepas isoladas mostram resistência aos agentes antimicrobianos de uso corrente em medicina veterinária (3). Baseando-se nestes fatos é necessário que se estabeleçam medidas profiláticas adequadas, pois as condições higiênico-sanitárias de um estabelecimento concorrem para a necessária prevenção, bem como para a saúde dos animais e do homem que convive com eles.

Em medicina humana um novo aspecto vem despertando interesse na tentativa de melhorar as condições de prevenção de determinadas doenças, notadamente causadas por microrganismos dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Essas medidas estão ligadas ao conhecimento de indivíduos chamados "portadores" que apresentam o microrganismo potencialmente patógeno, sem mostras de qualquer sintoma clínico da doença. Do ponto de vista epidemiológico, o papel do "portador" é de extrema importância, pois consiste numa fonte de infecção para indivíduos que, eventualmente, possam apresentar condições adequadas para o estabelecimento de infecções, tais como resistência diminuída por diferentes causas ou soluções de continuidade na pele e mucosas.

Em medicina veterinária, pouco tem sido feito na determinação de animais portadores, sendo este o objetivo no presente trabalho com bovinos em fase de lactação.

Material e Métodos

Colheita do material - Procedência das amostras - Foram utilizados para o isolamento de *S. aureus* amostras provenientes de 24 animais da espécie bovina, aparentemente saudáveis e em fase de lactação. Foram animais da raça Holandesa, pertencentes ao estábulo da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal, UNESP, controlados através de assistência médico-veterinária e se caracterizando por uma produção média diária de 15 litros de leite/animal.

O sistema de criação é semi-confinado e as instalações apresentam piso acimentado que é lavado 2 vezes por dia, nos intervalos entre ordenhas. De acordo com a rotina do estabelecimento os animais eram ordenhados 2 vezes por dia, às 4:00 e às 14:00hs pelo sistema de ordenha mecânica. Os animais no momento da ordenha eram contidos em bretes e tinham seus úberes e tetas lavados com pano comum utilizado para todos os animais.

A seguir, eram colhidas amostras de leite de todos os quartos do úbere de cada animal para o teste da caneca telada, sendo em seguida procedida a ordenha.

Para cada animal foram colhidas 3 amostras com auxílio de 3 zaragatoas esterilizadas obedecendo o seguinte esquema:

Zaragatoa 1 - uma amostra das fossas nasais (FN);

Zaragatoa 2 - uma amostra da parte externa do úbere e tetas antes do teste da caneca telada (UA);

Zaragatoa 3 - uma amostra da parte externa do úbere e tetas depois do teste da caneca telada (UD).

As zaragatoas eram acondicionadas em tubos de ensaio esterilizados e transportadas imediatamente ao laboratório.

Isolamento - O material era semeado pela técnica de esgotamento no meio de Ni (5) e incubado a 37°C por 48 horas.

As zaragatoas a seguir eram colocadas em tubos de ensaio contendo caldo simples e incubados pelo mesmo tempo e temperatura, para possível reisolamento, caso não houvesse crescimento no isolamento primário em ágar Ni.

Após as condições de temperatura e tempo preconizadas as cepas eram submetidas a outras provas.

Identificação das cepas - Prova de lecitinase - Esta prova foi realizada paralelamente ao isolamento em meio de Ni.

Prova de plasmocoagulase em lâmina - Utilizou-se culturas de 24hs de estafilococos

em ágar simples inclinado. Uma pequena fração do cultivo foi retirada com o auxílio de uma alça de platina e colocada em lâmina com uma gota de "pool" de plasma de coelho (EDTA) diluído a 1:10 em solução salina 0,85%, sendo a mistura homogeneizada e a leitura feita macroscopicamente de imediato. Para a eliminação de falsos positivos (cepas auto aglutinantes) cada amostra era também colocada frequente à solução salina 0,85%, não devendo apresentar grumos.

Prova de plasmocoagulase em tubo - As cepas a serem testadas eram semeadas em meio líquido de Mueller Hinton (Mueller Hinton Broth, Difco Laboratories) e incubadas por aproximadamente 18 horas a 37°C. Em seguida eram misturadas em partes iguais, em tubo de ensaio tipo hemólise, a cultura e o "pool" de plasma de coelho (EDTA) diluído a 1:5 sendo a mistura homogeneizada e incubada em banho-maria à 37°C por 24 horas. As leituras eram feitas na 1^a, 2^a, 4^a e 24^a horas.

Prova de desoxirribonuclease (DNase) - As amostras de estafilococos, obtidas de cultura de 24 horas em ágar simples inclinado, eram semeadas por picadas em placas contendo ágar DNase (DNase Test Agar, Difco Laboratories), obedecendo a um escantilhão de 8 a 12 posições. Assim em cada placa eram testadas de 8 a 12 cepas. O teste foi feito em duplicata. Após a incubação a 37°C por 48 horas fazia-se a inundação da placa com solução de ácido clorídrico a 1N. A leitura era feita após 10 minutos.

Antibiograma - Foi realizado pelo método de Bauer & Kirby (1) com modificações de Rocha & col. (7) e as amostras classificadas segundo os modelos de Barber & Burston (2).

Resultados

Os resultados obtidos na prova de lecitinase estão contidos na Tabela 1, tendo sido consideradas positivas as cepas que apresentavam um halo opalescente indicando a lise pela lecitinase da lecítina contida no meio de cultura.

Na prova de plasmocoagulase em tubo, foram consideradas positivas apenas as cepas que coagulavam totalmente o plasma (4+) com formação de coágulo firme no interior do tubo. Todas as demais (de 1 a 3+) foram consideradas negativas (Tabela 2).

Com relação ao teste de desoxirribonuclease (DNase) as cepas determinadas como positivas foram as que apresentaram halo de hidrolise ao redor da colônia, maior 4 ou mais vezes que o tamanho do inóculo. Os resultados desta prova estão sumarizados na Tabela 3.

A frequência de portadores de *S. aureus* no grupo de 24 animais aparentemente saudáveis examinados foi cerca de 41,67% uma vez de 10 animais apresentaram a presença de microrganismo que variou nos diferentes nichos como úbere depois (UD) com 8 animais positivos (33,33%) úbere antes (UA) com 07 (29,17%) animais positivos e fossas nasais com apenas 1 animal (4,17%) positivo. Com relação ao número de cepas por nicho e colonização observamos pela Tabela 4 que um mesmo animal apresentou colonização nos três nichos, quatro (4) em dois nichos e 5 em apenas um nicho. Também pela mesma tabela podemos notar que o úbere depois (UD) apresentou maior número de cepas isoladas, 39 (70,91%), para 15 (27,28%) da amostra do úbere antes (UA) e 01 (1,81%) das fossas nasais.

As cepas com resultados positivos (4+) na prova de plasmocoagulase foram levadas a elaboração do antibiograma cujos resultados estão descritos na Tabela 5.

A Tabela 6 demonstra os modelos de antibiograma segundo Barber & Burston (2) obtidos com as cepas de *S. aureus* isoladas.

Tabela 1 - Resultados obtidos na prova de lecitinase com cepas de estafilococos isolados

Nichos	Nº total de cepas	Resultados			
		Positivos	%	Negativos	%
NF	25	1	4,00	24	96,00
UA	55	16	29,09	39	70,91
UD	84	39	46,43	45	53,57

Tabela 2 - Resultados obtidos nas provas de plasmocoagulase em lâmina e tubo das cepas de estafilococos isolados

Nichos	Nº total de cepas	Resultados			
		Positivos	%	Negativos	%
FN	25	Lâmina	1	4,00	24
		Tubo	1	4,00	24
UA	55	Lâmina	15	27,27	40
		Tubo	17	30,90	38
UD	84	Lâmina	34	40,48	50
		Tubo	40	47,62	44

Discussão

Em portadores humanos as fossas nasais representam o local de eleição para a permanência de *S. aureus*. A literatura mostra que em portadores bovinos, este não é um local tão adequado e que a ocorrência de cepas de *S. aureus* nas fossas nasais de bovinos é relativamente pequena, mesmo em rebanhos onde infecções estafilocócicas são frequentes (4, 10).

Entretanto quando a pesquisa de portadores se restringe ao úbere, podemos observar um aumento na frequência de animais portadores, conforme observados pelos dados relatados. Dos 24 animais estudados 10 (41,64%) foram positivos para isolamento de *S. aureus* em pelo menos um dos nichos estudados. Entretanto, a associação úbere antes e depois (UA/UD) foi predominante, levando-nos a considerar por estes dados que o úbere em bovinos é um local mais adequado para pesquisa de *S. aureus* que as fossas nasais.

Tabela 4 - Relação entre animal, número de cepas e nicho colonizado em 10 animais positivos no isolamento de *S. aureus*

Animais nº %	Nicho/Nº cepas					Total
	FN	Nº cepas	UA	Nº cepas	UD	
1	+	1	+	1	+	1 3
4	-	-	+	12	+	35 47
2	-	-	+	2	-	- 02
3	-	-	-	-	+	3 03
10		1		15		39 55

As amostras determinadas como úbere depois (UD) foram as que apresentaram o maior número de cepas do referido microrganismo, quando consideramos que neste local havendo anteriormente um contato normal do manipulador, podemos sugerir que este

Tabela 3 - Resultados obtidos na prova de desoxirribonuclease com cepas de estafilococos isolados

Nichos	Nº total de cepas	Resultados			
		Positivos	%	Negativos	%
FN	25	1	4,00	24	96,00
UA	55	23	41,82	32	58,18
UD	84	30	35,71	54	64,29

fato pode estar concorrendo para aumentar o número de cepas isoladas sejam elas de outros locais do próprio animal e ou de origem humana. Tal afirmação poderá ser alicerçada em dados epidemiológicos mais indicativos tais como a prova de fagotipagem.

Tabela 5 - Modelos de antibiograma segundo Barber & Burston, (2), obtidos com as cepas estudadas

Nichos	Nº de amostras	Modelos							
		SSSS Nº %	RSSS Nº %	RRSS Nº %	RRRS Nº %	RRRR Nº %	RRSR Nº %	RSSR Nº %	SSRS Nº %
FN	1	0	0	0	1	0	0	0	0
VA	15	0	2	7	0	0	4	2	0
VD	39	12 30,76%	11 28,20%	6 15,38%	0	0	9 23,07%	0 1	1 2,56%

Tabela 6 - Resultados obtidos no antibiograma com cepas de *S. aureus* provenientes de diferentes nichos

Nichos	Nº de cepas	Antibióticos							
		Ampicilina 10mg		Cloranfenicol 30mg		Estreptomicina 10mg			
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
FN	1	1	0	1	0	1	0	0	0
UA	17	17 100%	0	0 100%	17 100%	11 64,70	06 35,30%		
UD	40	23 57,50%	17 42,50%	1 2,50%	39 97,50%	15 37,50%	25 62,50%		
Gentamicina 10mg									
Nichos	Nº de cepas	Penicilina 10mg		Tetraciclina 30mg					
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
		R	S	R	S	R	S	R	S
FN	1	0	1 100%	1	0	0	0	0	1 100%
UA	17	0	17 100%	17 100%	0	06 35,30%	11 64,70%		
UD	40	0	40 100%	25 62,50%	15 37,50%	09 22,50%	31 77,50%		

A determinação de portadores de *S. aureus* num rebanho pode ser considerado um ponto a mais na cadeia epidemiológica das mastites, podendo estabelecer com maior segurança quando a fonte de infecção é o próprio animal ou o homem, oferecendo possivelmente melhores condições de técnicas higiênico-sanitárias e de manejo adequadas.

Conclusões e consequências dos achados

Os resultados obtidos nos permitiram concluir que:

1. A frequência de portadores de *Staphylococcus aureus* nos animais do rebanho estudado foi 41,67%.
2. Dentre os dois nichos pesquisados a ocorrência do *S. aureus* foi maior no úbere após ser submetido a higiene pré-ordenha (UD), sendo de 33,34%; seguido das amostras UA com 29,17% e FN, 4,17%.
3. As cepas de *S. aureus* isoladas apresentaram elevada resistência a antibióticos, particularmente à penicilina e estreptomicina.
4. Todas as cepas foram sensíveis à gentamicina.
5. Os modelos de Barber & Burston mais frequentes foram nas amostras UD: SSSS (30,76%), RSSS (28,20%) e RRSR (23,07%); nas amostras UA: RRSS (46,67%); RRSR (26,67%) e RSSS e RSSR (13,33%).

Referências Bibliográficas

1. Bauer, A.M.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Turk, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Chem. Pathol., 45:439-496, 1966.
2. Barber, M. & Burston, J. - Antibiotic resistant staphylococcae infection: a study of sensitivity in relation to bacteriophage types. Lancet, 2:578-583, 1955.
3. Ferreira, L. & Melo, M.T. - Susceptibilidade antimicrobiana de estafilococos isolados de mastite bovina na zona da Mata de Minas Gerais. Pesq. Agrop. Bras., 16:445-451, 1981.
4. Hajek, V. & Marsalek, E. - A study of staphylococci isolated from upper respiratory tract of different animal species. Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig. A., 222:194-199, 1972.
5. Ito, I.Y.; Costa, A. & Barrachini, O. - Emprego de gema de ovo no isolamento de *Staphylococcus aureus*. An. Microbiol., 16:189-192, 1969.
6. Markham, N.P. & Markham, J.G. - Staphylococci in man and animals: distribution and characteristics of strains. J. Comp. Path., 76:49-56, 1956.
7. Rocha, H.; Zulian, M.L. & Trabulsi, L.R. - Antibiograma. Rev. Microbiol., 3:51-60, 1972.

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS ENTEROTOXIGÊNICO EM CARNE MOÍDA BOVINA NO RIO DE JANEIRO

Thais Leite de Souza
 & João Carlos de Oliveira Tórtora

Instituto Gonzaga da Gama Filho
 Universidade Gama Filho
 Rua Manoel Vitorino, 625
 20740 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

A análise de 42 amostras de carne moída bovina, obtidas em açou-gues do Estado do Rio de Janeiro, permitiu o isolamento de *Clostridium perfringens* numa frequência de 57,1% sendo 21,4% de amostras termo-resistentes e 7,1% de amostras enterotoxigênicas. As amostras de carne com maiores índices de contaminação apresentaram células de *C. perfringens* em número superior a $3,0 \times 10^5$ por grama. O número de *C. perfringens* enterotoxigênico variou de zero a $3,0 \times 10^2$ células viáveis por grama. O isolamento e a determinação do número de viáveis foram feitos empregando-se o meio de Willis & Hobbs (23) modificado pela adição do sulfato de canamicina (0,0001g/ml), sulfito de sódio (0,0008g/ml) e sulfato ferroso amoniacial (0,00025g/ml). Neste meio, as colônias de *C. perfringens* foram escuras e circundadas por um halo opalescente. Em algumas amostras de carne (23,8%) houve crescimento de *Streptococcus faecalis* que, quando predominou numericamente, dificultou o isolamento de *C. perfringens*.

Summary

Enterotoxigenic Clostridium perfringens in cattle ground meat in Rio de Janeiro

An analysis of 42 samples of cattle ground meat from butcher shop in Rio de Janeiro led to the isolation of *Clostridium perfringens* at a 57,1% frequency. From the isolated strains 21,4% were found to be heat-resistant and 7,1% were enterotoxigenic. The specimens showing greater contamination presented more than 3.0×10^5 *C. perfringens* per gram. The number of enterotoxigenic cells changed from zero to $3,0 \times 10^2$ viable cells per gram. The isolation and viable cells determination were carried out employing the Willis & Hobbs medium (23) modified by us. Kanamycin sulfate (0.0001g/ml), sodium sulfite (0.0008g/ml) and ferrous ammonium sulfate (0.00025g/ml) were added at the original EYA medium. In this medium *C. perfringens* developed black colonies rounded by an opalescent zone. A contaminant microorganism identified as *Streptococcus faecalis* grew from some specimens (23.8%) in the modified medium. When this microorganism prevailed in the plates the isolation of *C. perfringens* was difficult.

Introdução

O frequente envolvimento de *Clostridium perfringens* tipo A em casos de Rev. Microbiol., São Paulo, 17(4):356-363, Out./Dez. 1986.

toxinfecções alimentares humanas, em diversos países, tem levado vários microbiologistas ao estudo de meios e técnicas que permitam uma recuperação rápida e quantitativa desse microrganismo a partir de alimentos e fezes (1, 3, 6, 11, 14, 15).

O emprego de drogas antimicrobianas como a canamicina (15), D-cicloserina (3), neomicina (10, 11), polimixina (1, 15, 21) ou sulfadiazina (1), associadas às conhecidas características hemolítica, lecitinasica e sulfito redutora de estirpes dessa bactéria, permitiu o estabelecimento de meios seletivos e indicadores que facilitam o isolamento desse germe. Vários métodos foram propostos para o isolamento de *C. perfringens* a partir de diferentes fontes. Porém, a eficiência de cada um varia em função do estágio esporulado ou vegetativo em que se encontra o microrganismo, da flora microbiana contaminante, da constituição do espécime analisado, bem como de fatores inerentes a cada metodologia, como a homogeneização do espécime e a temperatura empregada para incubação ou tratamento inicial da amostra. Há, no entanto, um consenso geral de que essa bactéria seja das mais comuns nos casos de toxinfecções alimentares humanas, pela frequência com que tem sido isolada de alimentos e portadores em vários países, independentemente da metodologia utilizada (4, 8, 9).

Meios de cultura contendo gema de ovo têm sido empregados para o isolamento de *C. perfringens* em laboratório, baseados em modificações do meio previamente descrito por Willis & Hobbs (23). Na Tabela 1 estão descritos o meio EYA original (23) e as principais modificações feitas por diversos autores e por nós no meio básico de Willis & Hobbs (23).

No Brasil, a frequência de casos de toxinfecções alimentares por *C. perfringens* é completamente desconhecida, embora possa ser prevista uma alta incidência devida ao clima tropical, a falta de controle sanitário na manipulação e estocagem de alimentos em diversas cidades brasileiras e ao elevado número de portadores intestinais de *C. perfringens* enterotoxigênico, como recentemente demonstramos entre os habitantes da cidade do Rio de Janeiro (20). A presença desse germe no solo (20) é um outro fator relevante que aumenta a possibilidade de contaminação dos alimentos inadequadamente protegidos e que pode contribuir para uma elevação do número de portadores ou mesmo do número de casos de toxinfecção por este microrganismo.

No presente trabalho procuramos analisar amostras de carne moída bovina adquiridas em açouques localizados no Estado do Rio de Janeiro, para determinar a frequência de *C. perfringens* enterotoxigênico e avaliar a sua possível participação nos casos de toxinfecções alimentares em nosso país.

Material e Métodos

Amostras - Para a padronização das técnicas de isolamento e contagem foi utilizada a amostra enterotoxigênica de *C. perfringens* Cl.842, previamente isolada de carne bovina em nosso laboratório. As demais amostras desse microrganismo foram isoladas de carne moída bovina de diferentes açouques localizados no Estado do Rio de Janeiro. As culturas foram mantidas em meio de carne picada (CMM) e conservadas em duplicatas, à temperatura ambiente e congeladas.

Escolha da metodologia para isolamento de *C. perfringens* - Inicialmente foi feito um estudo sobre o rendimento dos meios SPS ágar (1), EYA (23) e ágar sangue glicosado (5) para a recuperação de esporos de *C. perfringens* e simultaneamente da combinação dos meios "fluid thioglycollate medium with dextrose - FIMD 135-C (BBL)" e "chopped meat medium - CMM" com amido (7) para pré-cultura e de diferentes temperaturas para pré-aquecimento ou incubação das amostras. Amostras de carne moída bovina esterilizadas em autoclave foram contaminadas com volumes decrescentes de uma suspensão de esporos da amostra enterotoxigênica de *C. perfringens* Cl.842, de modo a apresentarem $1,14 \times 10^3$ a $0,001 \times 10^3$ esporos por grama. Frações equivalentes a 1g da carne assim contaminada foram semeadas em 3 tubos contendo FIMD e em 3 tubos contendo CMM. Um tubo com FIMD e um com CMM foram aquecidos a 80°C durante 10 minutos e um com cada meio foi aquecido a 100°C durante 60 minutos,

logo após a semeadura. Todos foram incubados a 37°C durante 24 horas. Os dois tubos restantes, após semeados, foram incubados a 46°C até que houvesse produção de gás ou por um tempo máximo de 24 horas. Todos os tubos semeados e submetidos a diferentes tratamentos, que apresentaram gás, foram semeados na superfície dos meios EYA, SPS ágar e ágar sangue glicosado e incubados a 37°C durante 18 horas, em anaerobiose. O rendimento de cada meio foi estimado em cruzes, sendo (+++) para as placas com mais de 100 colônias, (++) para as placas contendo 10 a 100 colônias, (+) para as placas com menos de 10 colônias e (-) para as placas sem colônias características de *C. perfringens*.

Isolamento - Amostras de carne moída bovina, em número de 42, rotuladas como "carne fresca" e frequentemente mantidas sob refrigeração, foram colhidas durante o período outubro-1983 a fevereiro-1985 e examinadas no mesmo dia da compra. Não foi usado qualquer sistema especial para transporte das amostras. Frações correspondentes a 1 grama de cada amostra foram semeadas, em duplicata, em CMM com 1% de amido (7) sendo, em seguida, aquecidas em banho maria a 80°C durante 10 minutos e 100°C durante 60 minutos (22). Após resfriamento e incubação a 37°C durante 18 horas, as culturas com gás foram semeadas na superfície de EYA modificado por nós (Tabela 1) e incubadas a 37°C durante 24 horas em atmosfera anaeróbia contendo 80% de N₂, 10% de CO₂ e 10% de H₂. Sempre que possível, 10 colônias negras com halo opalescente foram selecionadas e identificadas segundo o esquema de Hayase & col. (5) modificado por Sousa (17). As amostras isoladas a partir dos tubos aquecidos a 100°C durante 60 minutos foram classificadas como termo-resistentes. As culturas classificadas como *S. faecalis* foram identificadas segundo Froshiber (2).

Enterotoxigenicidade - A síntese de enterotoxina pelas amostras de *C. perfringens* isoladas foi avaliada simultaneamente, pelo efeito letal em camundongos (12) e pela imunodifusão dupla radial (18) empregando-se o sobrenadante das culturas crescidas em meio de Tórtora (19). O número de *C. perfringens* enterotoxigenico foi estimado com base no percentual de colônias produtoras de enterotoxina e o número total de células viáveis desse microrganismo, em cada amostra de carne examinada.

Meio EYA modificado - Ágar-ágar, 2,0g; caldo infuso de carne, 100,0ml; lactose, 1,0g; vermelho neutro, 0,003g; pH 7,0. Após a autoclavagem a 110°C durante 15 minutos, o meio foi resfriado a 45-50°C e uma suspensão de gema de ovo (gema de ovo homogeneizada com igual volume de soro fisiológico esterilizado) foi adicionada para uma concentração final de 10% V/V. Ao meio básico foram adicionados 0,0001g de sulfato de canamicina (Kantrex-Bristol) segundo Hayase & col. (5), 0,0008g de sulfito de sódio segundo Shahidi & Ferguson (15) e 0,00025g de sulfato ferroso amoniacal por mililitro de meio. As soluções recentemente preparadas de sulfito de sódio e sulfato ferroso amoniacal foram, separadamente, esterilizadas por filtração (filtro tipo Seitz EK) e adicionadas assepticamente ao meio. Após a homogeneização, 15 mililitros do meio foram distribuídos em cada placa de Petri com 10 centímetros de diâmetro.

Determinação do número de células viáveis de *C. perfringens* - Frações de 1g de cada amostra foram semeadas, em duplicata, em 10ml de soro fisiológico esterilizado sendo, em seguida, um tubo aquecido a 80°C durante 10 minutos e o outro não. Após homogeneização durante 1 minuto (Super-mixer, Matheson Scientific) e diluições 10⁻¹ a 10⁻³ em soro fisiológico esterilizado, 1 mililitro de cada diluição foi semeado por técnica de "pour plate" em EYA modificado, adicionando-se 10 mililitros de agar-tioglicolato (16) logo após a solidificação do meio. A incubação foi em anaerobiose, a 37°C durante 24 horas. As colônias negras, com halo opalescente, foram contadas. O número de colônias obtido a partir do tubo aquecido a 80°C, multiplicado pelo fator de diluição da amostra foi considerado o número de esporos e o obtido a partir do tubo não aquecido, multiplicado pelo mesmo fator, foi considerado o número de células viáveis de *C. perfringens* por grama da amostra examinada.

Resultados

Nos estudos preliminares para a escolha da metodologia de isolamento de *C. perfringens* verificou-se que o meio SPS ágar apresentava rendimento inferior ao do EYA e ao do ágar sangue glicosado, independentemente da temperatura de incubação ou de tratamento da amostra e que as colônias de *C. perfringens* não se apresentavam escuras naquele meio. Também foi observado que o uso do meio CMM com amido era vantajoso em relação ao uso do meio FIMD, quando usados para pré-cultura e aquecimento das amostras. Os melhores resultados foram obtidos com a semeadura das amostras de carne moída em CMM com amido, seguida de uma incubação a 46°C ou de um aquecimento a 80°C durante 10 minutos com incubação a 37°C, semeando-se após, em EYA ou em ágar sangue glicosado e incubando-se a 37°C, em anaerobiose (Tabela 2). Com o emprego desta técnica foi possível a recuperação de esporos de *C. perfringens* em amostras de carne contendo até 1,14 esporos por grama. Com o aquecimento da amostra a 100°C durante 60 minutos, a recuperação só foi possível em carnes contendo um mínimo de $1,14 \times 10^3$ esporos por grama, fazendo-se a pré-cultura em CMM com amido, mas não em FIMD.

Tabela 1 - Composição de meios de cultura contendo gema de ovo, usuais para o isolamento de *C. perfringens* e do meio modificado neste trabalho

Composição (g)	Meios			
	Willis & Hobbs(1958)	Shahidi & Ferguson(1971)	Hayase & col. (1973)	Modificado
Ágar-ágar	2,0	2,0	2,0	2,0
Infuso de carne	90,0ml		90,0ml	90,0ml
Triptose		1,5		
Ext. levedura		0,5		
Lactose	1,0		1,0	1,0
Vermelho neutro	0,003		0,003	0,003
Gema de ovo 50% (emulsão salina)	10,0ml	10,0ml	10,0ml	10,0ml
Sulfito de sódio				0,08
Metabisulfito de sódio		0,1		
Sulfato ferroso amoniacial				0,025
Sulfato de canamicina		0,0012	0,01	0,01
Sulfato de polimixina B		3000U		
Citrato férrego amoniacial		0,1		
Água destilada		90,0ml		

C. perfringens, após 18 a 24 horas de incubação a 37°C, no meio modificado, desenvolveu colônias circulares, convexas, com tonalidade acinzentada e circundadas por um halo opalescente, decorrente da ação da lecitinase. Quando foram empregadas soluções de sulfito de sódio e sulfato ferroso amoniacial com mais de cinco dias de preparo, não houve desenvolvimento de colônias escuras. Nas placas provenientes de amostras não aquecidas ou aquecidas a 80°C durante 10 minutos, algumas vezes foram isolados cocos Gram positivos. Algumas colônias desses cocos foram selecionadas e identificadas como *Streptococcus faecalis* e, quando predominaram numericamente, dificultaram o isolamento de *C. perfringens*, embora fossem claras e desprovidas do halo de precipitado. Todas as colônias negras, com halo opaco, selecionadas para o teste de enterotoxigenicidade comportaram-se como *C. perfringens*.

Discussão

Em estudos preliminares, constatamos ser o meio EYA mais adequado ao isolamento de *C. perfringens*, a partir de amostras de carne moída bovina do que os meios SPS ágar comercial e ágar sangue glicosado. No meio SPS as colônias da amostra enterotoxigênica Cl.842 não se apresentaram escuras e foram recuperadas em número inferior ao encontrado nos outros meios. Resultados semelhantes foram previamente obtidos por Shahidi & Ferguson (15) que não encontraram bom rendimento com o meio SPS agar mesmo em casos em que o período de incubação, o tipo de alimento e os sintomas sugeriam haver envolvimento de *C. perfringens* nos casos de toxinfecção por eles analisados. Com o uso do meio ágar sangue com glicose, embora houvesse grande recuperação da amostra Cl.842, o seu emprego dificultou a seleção de colônias de *C. perfringens* quando foram estudadas as amostras de carne naturalmente contaminadas, com flora microbiana mista, exceto nas placas obtidas a partir das amostras de carne aquecidas a 100°C durante 60 minutos. Em nosso laboratório temos dado preferência ao uso do ágar sangue glicosado para o isolamento de *C. perfringens* de diversas fontes, sempre que fazemos um prévio tratamento do espécime a 100°C durante 60 minutos, pois as características das colônias neste meio facilitam a seleção de *C. perfringens*. As modificações por nós introduzidas no meio EYA foram decorrentes dos estudos anteriores de Hayase & col. (5) e de Shahidi & Ferguson (15) e, visaram tornar o meio EYA mais seletivo e indicador, para facilitar o isolamento de *C. perfringens*. O meio modificado permitiu uma recuperação eficiente das células de *C. perfringens* Cl.842, previamente adicionadas às amostras de carne, mesmo quando estas eram ressuspensas e homogeneizadas em soro fisiológico esterilizado, sem substâncias redutoras. Porém, em algumas placas houve grande crescimento de *S. faecalis* e, nessas placas, não foram encontradas colônias de *C. perfringens*, ou por não existirem, ou por serem pequenas demais para serem reconhecidas. O emprego simultâneo das temperaturas de 80 e 100°C para pré-aquecimento das amostras examinadas foi decorrente de termos encontrado bons resultados a 80°C e de uma tentativa de reduzir a flora microbiana contaminante com o aquecimento a 100°C.

A comparação dos resultados obtidos por pesquisadores em diferentes países, não pode ser feita facilmente, uma vez que a metodologia e a fonte de isolamento empregadas em cada caso, apresentam diferenças que, certamente, contribuiram para o resultado de cada autor. Porém, pelos resultados mais freqüentemente observados, podemos esperar que *C. perfringens* seja encontrado, na maioria dos alimentos, predominantemente na forma vegetativa e que ocorra rápida perda de viabilidade nos alimentos refrigerados (4). Os nossos resultados mostram que somente uma amostra de carne apresentou esporos em número suficiente para a sua avaliação, embora pela resistência ao aquecimento a 80°C durante 10 minutos possamos suspeitar da ocorrência de esporos em 57,1% das amostras examinadas (Tabela 3).

A resistência de *S. faecalis* a este tratamento térmico evidencia que não deve ser eliminada a possibilidade de algumas células vegetativas de *C. perfringens*

Tabela 2 - Comparação da eficiência de meios de cultura e diferentes temperaturas para a recuperação de esporos de *C. perfringens* em amostras de carne moída bovina contendo $1,14 \times 10^3$ esporos viáveis/g.

Símbolos: ASG = Ágar sangue com glicose; EYA = Egg-yolk agar; SPS = Sulfite-polymyxinsulfadiazine ágar; (a) = Ausência de colônias; (b) = Uma a dez colônias; (c) = Onze a cem colônias; (d) = Mais de 100 colônias

Temperatura de incubação ou aquecimento	Meios para pré-cultura					
	Fluid thioglycollate with dextrose (FTMD)			Chopped meat with starch (OMMS)		
	ASG	EYA	SPS	ASG	EYA	SPS
46°C	-(a)	-	-	+++ (d)	+++	+(b)
80°C	++ (c)	++	+	+++	+++	+
100°C	-	-	-	++	+++	+

terem suportado ao aquecimento. Nas dez amostras de carne inicialmente analisadas foi feito o isolamento de *C. perfringens* a 46°C e com prévio tratamento da amostra a 80°C durante 10 minutos incubando-se, a seguir, a 37°C durante 18 horas. Por não

Tabela 3 - Frequência de *C. perfringens* em 42 amostras de carne moída bovina.

Símbolos: a = Mais de $3000,0 \times 10^2$ células/g, b = negativo; c = Isolamento positivo sem determinação do número de células; d = Isolamento simultâneo de *C. perfringens* e de *S. faecalis* (+) ou, somente de *S. faecalis* (-)

Amostras	Células viáveis ($\times 10^2$)	Esporos viáveis ($\times 10^2$)	Termo- resistentes	Ent+ ($\times 10^2$)	Temperatura de isolamento (°C)	
					46	80
01	4,8	-	+c	-	-	-
02	80,0	-	-	-	-	+
03	1570,0	-	-	-	(+) ^d	(+)
04	120,0	-	-	-	+	(+)
05	>3000,0 ^a	-	-	-	+	+
06	60,0	-	-	12,0	+	+
07	10,0	-	-	-	+	-
08	48,0	-	-	-	(-)	+
09	>3000,0	-	-	-	+	+
10	60,0	-	-	-	+	+
11	- b	-	-	-	-	(-)
12	-	-	-	-	-	(-)
13	7,1	-	+	-	-	+
14	-	-	-	-	-	(-)
15	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-
17	1,9	-	+	0,8	-	(-)
18	-	-	-	-	-	+
19	-	-	-	-	-	-
20	0,2	-	-	-	-	(-)
21	1470,0	-	+	-	-	+
22	-	-	-	-	-	-
23	0,6	0,1	-	-	-	+
24	73,0	-	-	-	-	+
25	4,2	-	-	-	-	+
26	-	-	-	-	-	-
27	-	-	+	-	-	+
28	-	-	-	-	-	-
29	-	-	+	-	-	-
30	-	-	-	-	-	+
31	2,0	-	-	-	-	+
32	0,2	-	-	-	-	+
33	-	-	-	-	-	-
34	0,6	-	-	-	-	(-)
35	-	-	-	-	-	-
36	-	-	+	-	-	+
37	5,0	-	-	-	-	+
38	90,0	-	+	-	-	(+)
39	-	-	-	-	-	-
40	2,0	-	-	-	-	+
41	3,0	-	-	3,0	-	+
42	8,0	-	+	-	-	(+)
Total (%)	1 (2,3)	9 (21,4)	3 (7,1)	7 (70,0)	24 (57,1)	

encontramos diferenças significativas quanto ao rendimento desses dois métodos (Tabela 3) optamos por empregar somente o último para estudo das 33 amostras restantes de carne, uma vez que a temperatura de 80°C limita, de forma mais eficiente, a flora microbiana contaminante.

A ocorrência de *C. perfringens* em alimentos tem sido demonstrada por diversos microbiologistas (1, 5, 13, 14). Porém, a maioria dos estudos visa a determinação do número desse germe por grama do alimento, capaz de sugerir a ocorrência ou não de uma contaminação fecal. Desta forma, a enterotoxigenicidade das amostras isoladas só raramente é avaliada. Assim, embora a literatura específica venha acumulando, em grande número, os resultados de investigações sobre a frequência de *C. perfringens*, termo-resistente ou não, em alimentos (1, 5, 13, 14) ela carece de dados sobre a frequência de *C. perfringens* enterotoxigênico em tais alimentos. No presente estudo, a detecção de 21,4% de *C. perfringens* termo-resistentes e de 7,1% de amostras enterotoxigênicas evidenciam uma contaminação frequente, principalmente considerando-se que as amostras de carne moída examinadas, em geral, estavam sob refrigeração e foram compradas às segundas-feiras, aumentando o tempo de refrigeração durante os fins de semana e, possivelmente, reduzindo o número de viáveis. Desta forma, os resultados representam um índice de contaminação mínimo das amostras analisadas, já que foram estudadas nas condições em que são vendidas à população e não nas condições ideais para a preservação de gérmenes anaeróbios como o *C. perfringens*. Pelos resultados previamente encontrados nas fezes (18,5%), no solo (7,0%) e, no presente trabalho, em carne moída bovina (7,1%) podemos verificar que as amostras enterotoxigênicas de *C. perfringens* existem em elevada frequência em nosso ambiente e admitir uma possível e importante participação dessa bactéria em casos de toxinfecções alimentares entre os habitantes do Estado do Rio de Janeiro. Porém, a relativa benignidade do quadro, a falta de laboratórios especializados para o diagnóstico e a falta de consulta médica na maioria dos pacientes acometidos, faz com que somente casos esporádicos sejam descritos entre nós (13) e que a precisa participação desta bactéria nas intoxicações alimentares humanas permaneça desconhecida.

Referências Bibliográficas

1. Angelotti, R.; Hall, H.E.; Foter, M.J. & Lewis, K.H. - Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.*, 10:193-199, 1962.
2. Frobisher, M. - Fundamentals of microbiology. 8.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1968.
3. Fuzi, M. & Csukás, Z. - New selective medium for the isolation of *Clostridium perfringens*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 16:273-278, 1969.
4. Genigeorgis, C. - Public health importance of *Clostridium perfringens*. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 167:821-827, 1975.
5. Hayase, M.; Mitsui, M.; Tamai, K.; Nakamura, S. & Nishida, S. - Isolation of *Clostridium absonum* and its cultural and biochemical properties. *Infect. Immun.*, 9:15-19, 1974.
6. Hobbs, B.C.; Smith, M.E.; Oakley, C.L.; Warrack, H.G. & Cruickshank, J.C. - *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.*, 51:75-101, 1953.
7. Holdeman, L.V. & Moore, W.E.C. - Anaerobe laboratory manual. 2.ed. Blacksburg, Virginia Polytechnic Institute, 1972.
8. Horodniceanu, T. & Săsăman, A. - Sur l'incidence du *Clostridium perfringens* type "F" et type "A" thermorésistant, dans l'intestin de sujets sains. *Arch. Roum. Pathol. Expér.*, 20:709-715, 1961.
9. Itoh, T. - Incidence of heat resistant *Clostridium perfringens* in feces of healthy subjects, serotyping of isolates, and food poisoning caused by new serotype organisms. *Ann. Rep. Tokyo Met. Res. Lab. Pub. Hlth.*, 24:7-39, 1973.
10. Lowbury, E.J.L. & Lilly, H.A. - A selective plate medium for *Clostridium welchii*. *J. Pathol. Bacteriol.*, 70:105-109, 1955.
11. Marshall, R.S.; Steenbergen, J.F. & McClung, L.S. - Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 13:559-563, 1965.

12. Sakaguchi, G.; Uemura, T. & Riemann, H.P. - Simplified method for purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Microbiol.*, 26:762-767, 1973.
13. Salzberg, S.P.; Massaguer, P.R. & Serrano, A.M. - Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 13:26-30, 1982.
14. Săsărman, A.; Horodniceanu, T.; Solomon, E. & Milosescu, P. - Contributions to the study of the methods applied for the isolation of *Clostridium perfringens*. II - Isolation of *Clostridium perfringens* from food stuffs (sausages) by the enrichment techniques at 46C - 47C. *Microbiol. Parazitol. Epidemiol. Bucharest*, 6:421-424, 1961.
15. Shahidi, S.A. & Ferguson, A.R. - New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.*, 21:500-506, 1971.
16. Sharf, J.M. - Exame microbiológico de alimentos. 2.ed. São Paulo, Polígono, 1972.
17. Sousa, T.L. - Isolamento e caracterização de *Clostridium absonum* de amostras de solo. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1976. (Tese de Mestrado).
18. Stark, R.L. & Duncan, C.L. - Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.*, 4:89-96, 1971.
19. Tortora, J.C.O. - Alternative medium for *Clostridium perfringens* sporulation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:1172-1174, 1984.
20. Tortora, J.C.O. & Costa, G.A. - The suitability of Tortora's medium for the production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strains. *Microbiol. Immunol.*, 29:509-516, 1985.
21. Wetzler, T.F.; Marshall, J.D. & Cordella, M.A. - Rapid isolation of Clostridia by selective inhibition of aerobic flora. I - Use of sorbic acid and polymyxin B sulfate in a liquid medium. *Am. J. Clin. Pathol.*, 26:418-421, 1956.
22. Wijewanta, E.A. - Heat-resistant *Clostridium welchii* in Ceylon soils. *J. Pathol. Bacteriol.*, 88:339-342, 1964.
23. Willis, A.T. & Hobbs, G. - A medium for the identification of Clostridia producing opalescence in egg-yolk emulsions. *J. Pathol. Bacteriol.*, 75:229-305, 1958.

OCORRÊNCIA DE ÁCIDO OXÁLICO NA BIOSSÍNTSE DE PENICILINA

Ana Maria Fernandez Diez

Squibb Indústria Química S.A.
Av. João Dias, 1084
Caixa Postal 7225
04724 São Paulo SP, Brasil

José Abrahão Neto
& Bruno Carlos de Almeida Cunha

Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Caixa Postal 30786
01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foi observado, em processo industrial de produção de penicilina, que em aproximadamente 20% dos tanques havia a formação de cristais de oxalato de cálcio. Nestes tanques a produtividade era pouco superior a 80% da de tanques normais. O teor de oxalato nos tanques com baixa produtividade atingiu 10 a 20 vezes o encontrado em tanques normais. Dos tanques com problemas foi isolada uma variante apigmentada de *Penicillium chrysogenum* que produzia 1,27g/l de oxalato e apresentava uma produtividade de penicilina igual a 18,5% da normal.

Summary

Oxalic acid in penicillin industrial fermentation

In a industrial process of penicillin fermentation, it was observed in about 20% of the batches the presence of calcium oxalate crystals. In these, the antibiotic production reached only 80% of the normal levels, whereas the oxalic acid level was 10 to 20 times higher than the expected. From the broth of these batches, a pigmentless variant of *Penicillium chrysogenum* was isolated. It produced only 18.5% of the normal levels of penicillin and 1.27g/l of oxalic acid.

Introdução

A cepa de *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951 é a ancestral das cepas atualmente utilizadas na produção industrial de penicilina. Dela se originou, por isolamento de esporos, tratamento com ultravioleta, exposição a raios X, e sujeição a mostarda de nitrogênio (mecloretamina) - a linhagem Wis 51-20 progenitora das cepas utilizadas pela Lilly Industries Ltd. (13) e E.R. Squibb & Sons, Inc. (14), por exemplo.

A biossíntese de penicilina, pelo *P. chrysogenum*, se dá, em essência, através da rota metabólica esquematizada na Figura 1.

Normalmente a fermentação industrial se processa com bom rendimento, em meio contendo água de milho (5). Durante a trofofase o *Penicillium* utiliza os componentes do meio para seu desenvolvimento para depois iniciar a produção de

penicilina. A alimentação programada de glicose, durante a fermentação, permite a produção de elevados níveis do antibiótico (6).

Na produção industrial de penicilina, na Squibb Indústria Química S.A., em alguns tanques com produtividade mais baixa do que a usual, ocorreu a formação de cristais. Neste trabalho procurou-se identificar estes cristais e estabelecer a relação entre eles e a queda de produtividade.

Material e Métodos

Microrganismo - *P. chrysogenum SG-6375* - Esporos deste microrganismo foram conservados sob nitrogênio líquido. A propagação foi feita em meio com canjica de milho. Após plaqueamento, colônias típicas foram isoladas e utilizadas para inoculação do meio de germinação em frascos agitados.

Dosagem do ácido oxálico - Baseado na reação com difenilamina. Desenvolve-se uma coloração azul que permite a quantificação do ácido oxálico em solução no meio (7).

Solubilização dos cristais - O caldo fermentado foi acidificado com HCl concentrado. Após filtração acertou-se o pH do filtrado para 6,5 com NaOH. Adicionou-se CaCl₂ para precipitação do oxalato.

O precipitado foi lavado repetidas vezes com ácido acético.

O precipitado foi a seguir lavado com material e seco a 70°C. A cada porção do precipitado acrescentou-se 0,5g de difenilamina e 5ml de H₃PO₄ concentrado. A seguir os tubos foram colocados em banho de óleo a 148-162°C por 50 minutos.

Após resfriamento adicionou-se 10ml de etanol e os tubos foram reaquecidos a 70°C.

A seguir fez-se diluição apropriada com água destilada e procedeu-se à leitura em um espectrofotômetro Varian 6345 a 600nm (7).

A viscosidade (V.M.) foi determinada por meio de Viscosímetro Brookfield Eng. Lab., com bobina SB-1 a 60rpm. A viscosidade relativa é expressa em porcentagem do valor final da viscosidade de tanques normais.

A dosagem de penicilina foi feita em HPLC.

Sistemas de cromatografia Waters.

Injetor Redyne 7125 "loop" fixo de 20µl.

Bomba modelo 6000-A.

Detetor de UV modelo 441.

Coluna tipo reversa C-18 com partículas esféricas de 10µ para uso em sistema de compressão RCM 100.

Integração pelo "Data Module 730-Waters".

Fase móvel - 39% metanol; 1,5ml ácido acético; pH 5,8-5,9.

Fluxo 1,5ml/minuto.

Caldo filtrado em membrana "Millipore" 0,25µ.

A potência química relativa está expressa como porcentagem da potência química final do tanque normal tomado como controle.

Resultados e Discussão

Nas fermentações em escala industrial onde foram constatados cristais, identificados como oxalato de cálcio, observaram-se diferenças na viscosidade, potência química e produtividade. Os resultados foram relativamente mais baixos quando comparados aos tanques normais, sem oxalato de cálcio.

A baixa viscosidade poderia ser causada pela ação mecânica e/ou tóxica dos cristais de oxalato de cálcio sobre o micélio e sua consequente fragmentação.

No total de 307 fermentações foram obtidos 254 tanques normais, isto é, sem cristais de oxalato de cálcio e 53 com cristais ou seja 17,3% do total dos fermentadores. Os tanques com cristais tiveram uma conduta operacional sem problemas, isto é, sem parada de força, contaminação ou qualquer outro tipo de desvio no processo.

Figura 1 - Esquema simplificado da biossíntese da penicilina
(adaptado de 1, 3, 5, 6, 7)

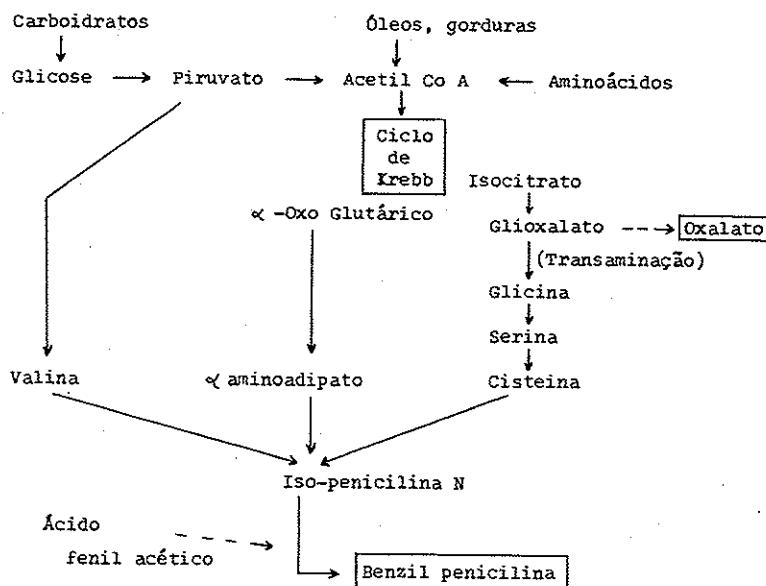


Figura 2 - Resultados de produtividade e viscosidade relativas do F-1 e F-2.

Símbolos: F-1 = Fermentador normal; ● = potência química; ■ = viscosidade; F-2 = Fermentador com cristais; ○ = potência química; □ = viscosidade

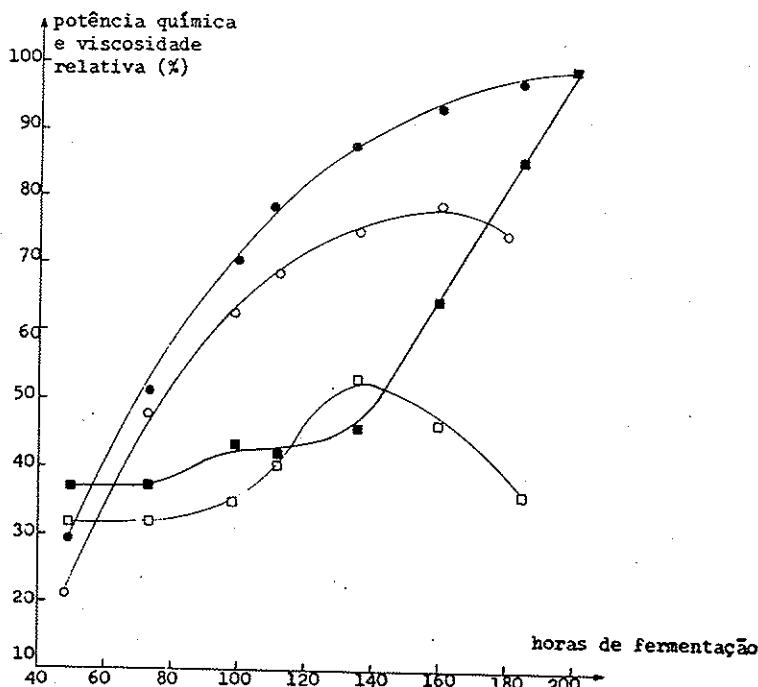
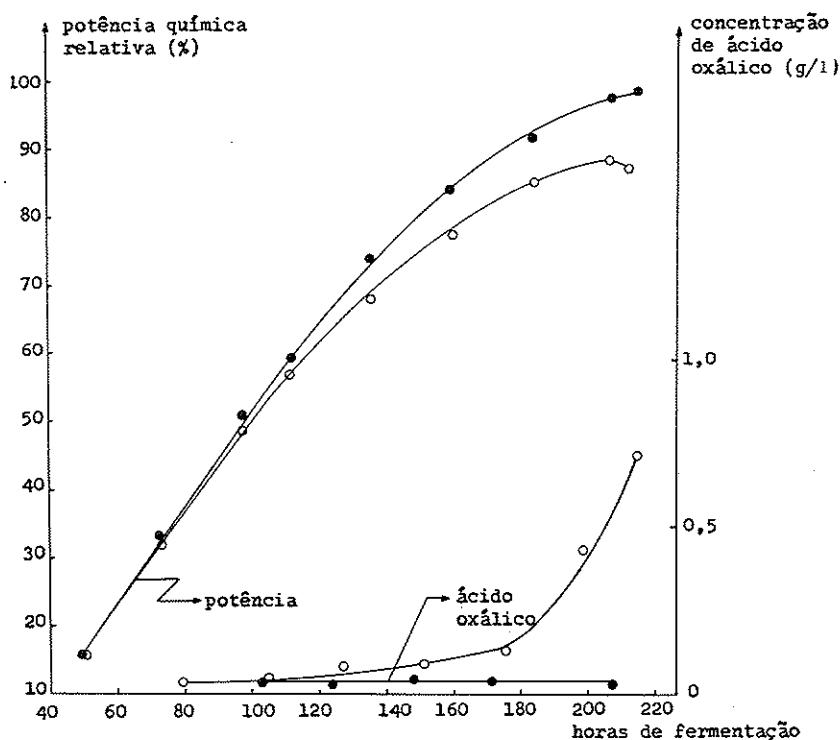


Figura 3 – Dados de potência química relativa e dosagens de ácido oxálico.

Símbolos: • = F-3 fermentador normal; o = F-4 fermentador com cristais



A produtividade relativa dos fermentadores com cristais foi de 82,7% o que implicou em uma perda significativa de produção de penicilina.

A Figura 2 mostra o perfil de um tanque normal e um tanque com cristais. Verificou-se uma queda acentuada na viscosidade do fermentador contendo cristais. Neste fermentador (F-2) a produtividade foi de 75,1% de uma fermentação normal (F-1).

As Figuras 3, 4 e 5 mostram os perfis de tanques normais e com cristais, no que se refere à potência química relativa e à concentração de ácido oxálico.

Melkinova (11) constatou que há uma relação inversa entre produção de ácido oxálico e produção de penicilina em fermentações com *P. chrysogenum*.

Neste trabalho o nível de ácido oxálico encontrado em fermentações normais se situava entre 0,02 e 0,04g/l enquanto que em fermentações onde haviam cristais de oxalato de cálcio encontrou-se 0,2 a 0,7g/l (Figuras 3, 4 e 5).

O alto nível de ácido oxálico indicou haver um desvio metabólico no sentido de sua formação com prejuízo da biossíntese de penicilina.

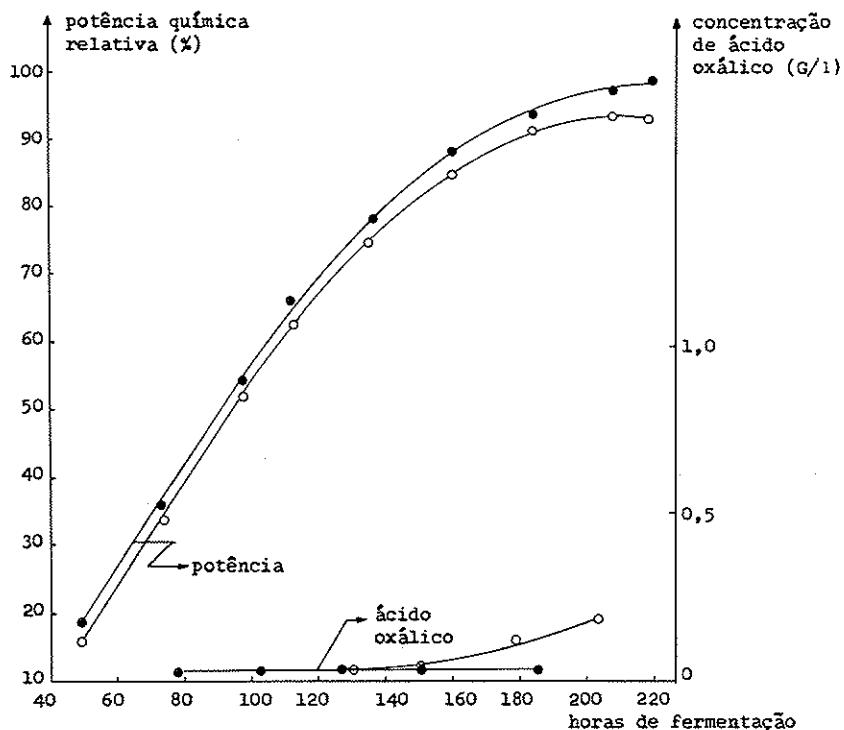
A Figura 1 apresenta um caminho biossintético da penicilina.

Podemos observar que o glioalato, por uma reação de transaminação, resulta em glicina. Esta reação é catalisada por uma enzima (transaminase) que necessita de ácido glutâmico e um co-fator que é a vitamina B₆ (8, 9, 10).

A falta de vitamina B₆, ou de ácido glutâmico, ou qualquer fator que bloqueie a enzima ocasionaria um acúmulo de glioalato e falta de cisteína, que é um dos precursores da molécula de benzil-penicilina, com consequente queda na produção de penicilina.

Figura 4 - Dados de potência química relativa e dosagens de ácido oxálico.

Símbolos: • = F-5 Fermentador normal; o = F-6 Fermentador com cristais



O gioxalato por oxidação resulta em ácido oxálico (12), portanto seu acúmulo poderia levar a um aumento de ácido oxálico e consequentemente oxalato de cálcio.

A glicina também é importante para a formação de pigmentos (12). Colônias que tivessem pigmentação diminuída ou totalmente perdida, poderiam denotar a perda de capacidade de produzir glicina a partir de gioxalato com seu consequente acúmulo em ácido oxálico.

Um plaqueamento feito a partir de um caldo fermentado que continha cristais mostrou a ocorrência de colônias totalmente brancas. Colocando-se estas colônias em meios propícios para a sua esporulação, não se obteve a esporulação pretendida.

Estas colônias brancas mostram uma baixa produção de penicilina e produção aumentada de ácido oxálico, sendo respectivamente de 18,5% e 1,27g/l.

Colônias que têm reduzida capacidade de formar esporos, têm a coloração verde diminuída até chegar a coloração branca (2). Portanto, pode existir um elo entre a pigmentação e a falta de glicina por algum bloqueio na reação gioxalato-glicina.

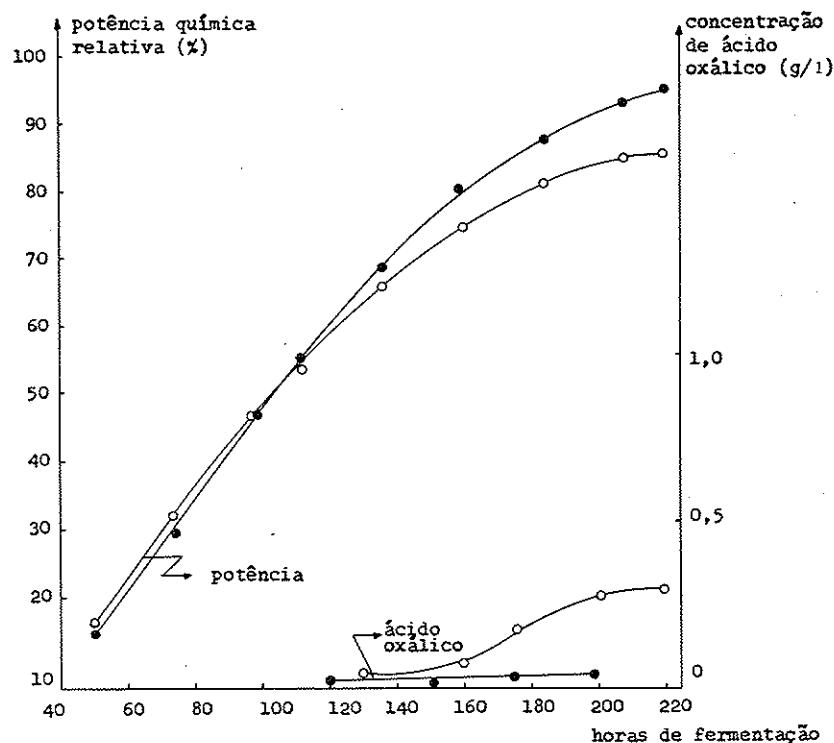
Isto mostra que é muito importante evitar a degeneração dos "tipos parentais" durante o próprio processo de fermentação pelo fornecimento de substratos adequados.

Conclusões

Cristais com formas definidas, observados durante fermentações industriais de penicilina foram identificados como sendo de oxalato de cálcio.

Figura 5 - Dados de potência química relativa e dosagens de ácido oxálico.

Símbolos: ● = F-7 Fermentador; ○ = F-8 Fermentador com cristais



Estes cristais possivelmente causaram mudanças nas características reológicas do caldo, fragmentando o micélio com consequente queda da viscosidade.

Em fermentações contendo cristais a produtividade e potências químicas relativas foram menores que as normais (sem cristais).

Em fermentações contendo cristais, foi verificado um aumento significativo de ácido oxálico, indicando um desvio metabólico que leva a um acúmulo desse ácido com consequente formação de cristais.

O aparecimento de culturas atípicas com baixa pigmentação e capacidades de produzir esporos parece estar intimamente relacionada aos fenômenos de desvio metabólico com aumento da produção de ácido oxálico, oxalato de cálcio e diminuição da produção de penicilina.

Referências Bibliográficas

1. Almeida Cunha, B.C. - Produção de antibióticos. In: - Lima, E.; Aquarone, E. & Borzani, W., ed. - Tecnologia das fermentações. São Paulo, Edgard Blucher, p.113-156, 1975.
2. Calam, C.T. - The long term storage of microbial cultures in industrial practice. In: - Kirpsop, B.E. - The stability of industrial organism: symposium held at University New Castle, Friday 20, July 1979. Kew, Commonwealth Agricultural Bureau, p.32-38, 1980.
3. Cooney, C.L. & Acevedo, F. - Theoretical conversion yields for penicillin synthesis.Biotechnol. Bioeng. (New York), 19:1449-1462, 1977.

4. Cooney, C.L.; Demain, A.L.; Dunhill, P.; Humphrey, A.E.; Lilly, M.D. & Wang, D.I.C. - Fermentation & enzyme technology. New York, John Wiley, 1979.
5. Demain, A.L. - Biochemistry of penicillin and cephalosrin fermentation. *Lloydia* (Cincinnati), 37:147-167, 1974.
6. Demain, A.L. - The mechanism of penicillin biosynthesis. *Adv. Appl. Microbiol.* (New York), 1:23-34, 1959.
7. Diez, A.M.F. - Correção de um desvio metabólico na produção industrial de penicilina. Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1985. (Tese de Mestrado).
8. Lehninger, A.L. - Bioquímica. São Paulo, Edgard Blucher, v.1, 1976.
9. Lehninger, A.L. - Bioquímica. São Paulo, Edgard Blucher, v.2, 1976.
10. Lehninger, A.L. - Bioquímica. São Paulo, Edgard Blucher, v.3, 1976.
11. Melnikova, A.A. & Semikova, E.I. - Oxalic acid production by *Penicillium chrysogenum* in biosynthesis of penicillin. *Izv. Akad. Nauk SSSR, Ser. Biol. (Moscow)*, p.579-583, 1957.
12. Oginsky, E.L. & Umbreit, W.W. - An introduction to bacterial physiology. São Francisco, W.H. Freeman, 1955.
13. Sermonti, G. - Genetics of antibiotics producing microorganisms. New York, John Wiley, 1969.
14. Thoma, R.W. - Use of mutagen in the improvement of production strains of microorganisms. *Folia Microbiol. (Prague)*, 16:197-204, 1971.

EFEITO DO ETANOL NA ATIVIDADE FERMENTATIVA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Sonia Maria Freitas de Moraes
Eugenio Aquarone

Deptº de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Caixa Postal 30786
01051 São Paulo SP, Brasil

Anthony H. Rose

School of Biological Sciences
University of Bath
BA2 7AY, Bath
England

& Michael J. Beavan

Weston Research Center
Toronto Ontário
Canada

Resumo

A atividade fermentativa (QCO_2) de células de *Saccharomyces cerevisiae* Y185 suplementadas com ácido oleico e ergosterol foi menos afetada por diferentes concentrações de etanol do que as células suplementadas com ácido linoleico e ergosterol. A viabilidade destas últimas foi mais afetada. Além disso, encontrou-se evidências de que o etanol afeta a atividade fermentativa por um processo de inibição não-competitiva.

Summary

Ethanol effect on fermentative activity from Saccharomyces cerevisiae

The fermentative activity (QCO_2) of *Saccharomyces cerevisiae* Y185 supplemented with oleic acid and ergosterol was less affected by different concentration of ethanol than same cells supplemented with linoleic acid and ergosterol. The viability of these last ones was more affected. Moreover, evidence was found about the non-competitive inhibition of ethanol in fermentative activity of yeasts.

Introdução

Com o intuito de se descobrir as bases fisiológicas da tolerância alcoólica de *Saccharomyces cerevisiae*, inúmeros trabalhos já foram publicados, cada qual abrangendo um aspecto diferente da ação de etanol ou outros álcoois. Foi examinado o efeito do etanol no consumo de açúcar (7), na multiplicação celular (10), na velocidade específica de crescimento (1, 8) e na viabilidade celular (9).

O estudo da cinética de inibição do etanol na velocidade específica de crescimento e na atividade fermentativa (5) demonstrou diferenças na magnitude e

complexidade dessas inibições. Além disso, foram encontrados valores de K_i para a morte celular provocada pelo etanol, menores do que os valores de K_i para outros dois parâmetros estudados.

No presente trabalho, foram incorporados, à membrana citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* Y185, dois diferentes tipos de ácidos graxos de diferentes graus de insaturação e um esterol, sabendo-se que *Saccharomyces cerevisiae*, quando cultivado sob condições anaeróbicas, torna-se auxotrófico para um esterol e um ácido graxo insaturado (2, 3). Células com membranas enriquecidas com ácido oleico ($C_{18:1}$) e ergosterol serão comparadas com células de membranas enriquecidas com ácido linoleico ($C_{18:2}$) e ergosterol. A atividade fermentativa (CO_2) e a viabilidade frente a diferentes concentrações de etanol foram estudadas.

Material e Métodos

Microrganismos e meio de cultura - A cepa haplóide *Saccharomyces cerevisiae* Y185 foi mantida em culturas a 4°C, contendo extrato de malte, 3g; extrato de levedura, 3g; glicose, 10g; peptona 0,5g e ágar, 20g e repicadas a cada seis semanas. As culturas eram feitas sob condições anaeróbicas em balões de fundo chato de 2 litros de capacidade, contendo anaeróbicas em balões de fundo chato de 2 litros de capacidade, contendo um litro de meio de cultura, sob atmosfera de nitrogênio. O meio de cultura continha, por litro de água destilada: glicose, 50g; $(NH_4)_2SO_4$, 30g; KH_2PO_4 , 4,5g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,25g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,25g e extrato de levedura 1,0g.

Suplementação - Depois de autoclavados, colocados sob atmosfera de nitrogênio e resfriados, os meios de cultura eram suplementados com 5mg de ergosterol e 30mg de ácido oleico ($C_{18:1}$) ou ácido linoleico ($C_{18:2}$) na forma de soluções alcoólicas (etanol 95% v/v), sendo o volume total adicionado de 3ml.

Inoculava-se o meio com 1mg (massa seca) de células, incubava-se a 30°C sob agitação magnética de 250rpm.

O crescimento era medido turbidimetricamente (A_{600}) e relacionado com massa seca, através de uma curva de calibração.

Determinação da atividade fermentativa - A fermentação, produção de etanol e gás carbônico, foi acompanhada, observando-se as velocidades de produção de CO_2 num Respirômetro Gilson.

As leveduras na fase exponencial de crescimento (0,28mg/ml - massa seca) eram colhidas por filtração (membrana Gelman; 1,2 μ m; 97mm), lavadas com tampão citrato (ácido cítrico e citrato trissódico, 100mM) pH 4,5 e ressuspensas no mesmo tampão, obtendo-se a concentração de 0,7mg/ml de células (massa seca). O tampão citrato (100mM), glicose (300mM), etanol e água destilada foram colocados no corpo principal do frasco (capacidade 16ml) do respirômetro até o volume total de 2,5ml.

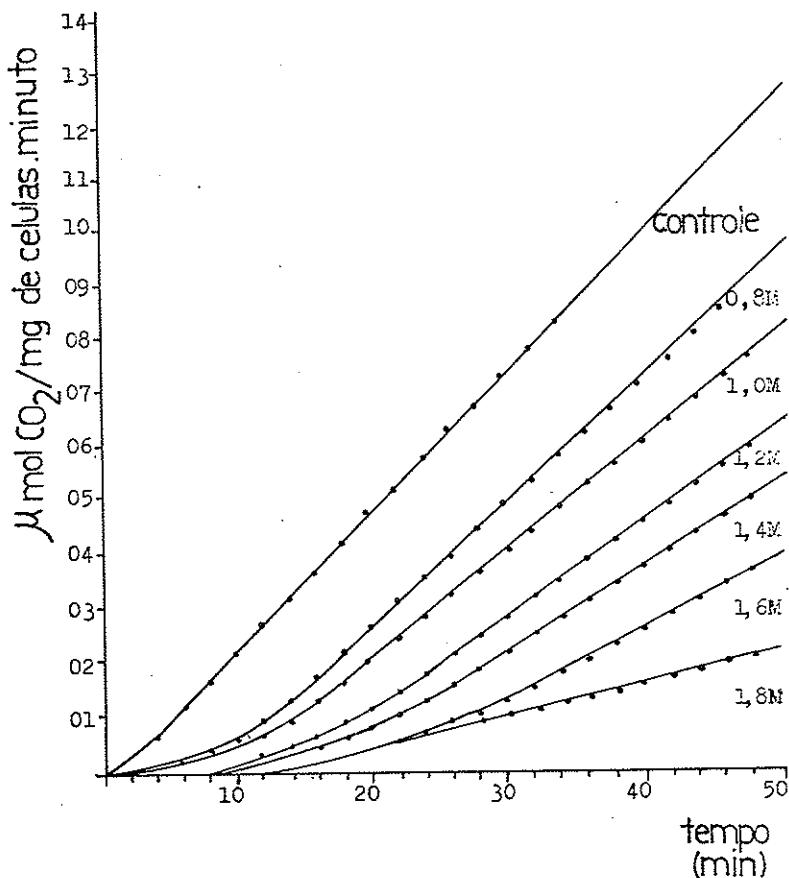
No braço lateral foi colocado 0,5ml da suspensão de microrganismos, os frascos foram conectados ao respirômetro, cujo banho-maria estava a 30°C e passava-se nitrogênio gasoso através dos mesmos por meio de um distribuidor "Manifold". Os frascos eram agitados a 100 oscilações por minuto, por 15 minutos, para equilíbrio do sistema, após o que as válvulas dos manômetros eram fechadas e a agitação interrompida. O conteúdo dos frascos foi misturado rapidamente e a agitação reiniciada. As leituras manométricas (em μl) de produção de CO_2 foram anotadas a cada dois minutos e convertidas para CNTP.

Determinação de viabilidade - O método de coloração com azul de metileno (6) foi usado para se determinar a viabilidade das células após os experimentos com respirômetro. Uma pequena porção da suspensão foi corada com azul de metileno (0,01% v/v, contendo 2% v/v de citrato trissódico) por 10 minutos. Foram empregados 500 microrganismos para contagem, verificando-se a absorção do corante num hemacitômetro.

Resultados e Discussão

Logo após a adição da suspensão de células ao interior do frasco do respirômetro, dava-se inicio à fermentação com produção acentuada de CO_2 , à velocidade constante. Em presença de etanol, a liberação de CO_2 somente se iniciava após curta fase "lag" (4 a 15 minutos), cuja duração aumentava proporcionalmente ao aumento da concentração de etanol. Este fato já fora observado (4, 5), concluindo-se, que a fase era devida à dificuldade de homogeneização de células e etanol nos frascos. Depois dessa fase inicial não-linear, a produção de CO_2 variou linearmente com o tempo e sua velocidade diminuiu proporcionalmente ao aumento da concentração de etanol nos diferentes frascos.

Figura 1 - Produção de CO_2 em função do tempo para células de *S. cerevisiae* Y185 mantidas num respirômetro Gilson em presença de diferentes concentrações de etanol



A Figura 1 mostra a relação $\mu\text{mol CO}_2/\text{mg} \cdot \text{min}$ versus $t(\text{min})$. A velocidade de produção de CO_2 no frasco controle (sem etanol) e nos frascos contendo diferentes concentrações de etanol foram calculadas a partir da inclinação das retas obtidas (6).

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos com células suplementadas com ácido oleico (C18:1) e com células suplementadas com ácido linoleico (C18:2),

respectivamente. A velocidade de produção de CO_2 em presença de 0,8M de etanol foi reduzida em cerca de 10%, no primeiro caso e, em cerca de 20%, no segundo caso. Essa diferença se mantém até a concentração de 1,6M, sempre com desvantagem para as células com ácido linoleico, sendo que nesta última concentração, as mesmas apresentam menos de 85% de células viáveis.

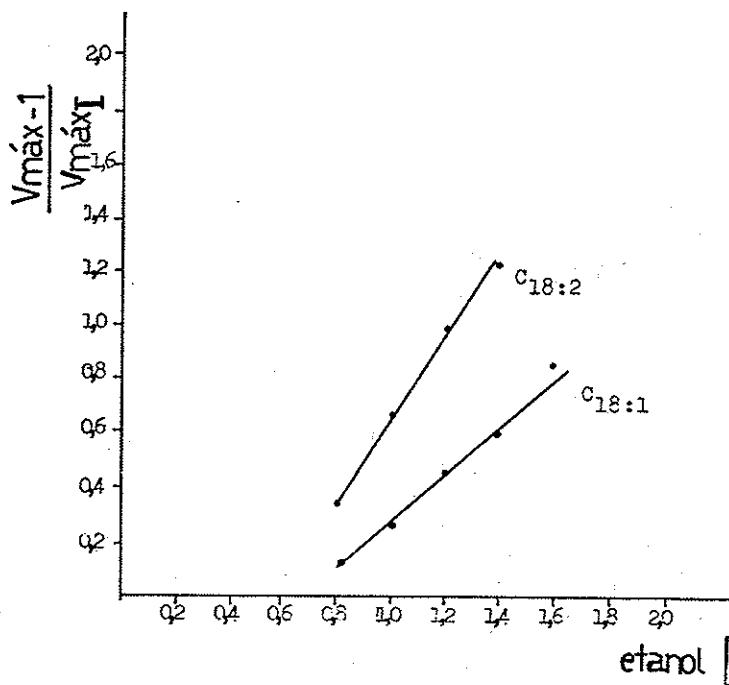
Sabe-se que o efeito do etanol no crescimento celular apresenta cinética de inibição não competitiva (1). Na atividade fermentativa, as mesmas características cinéticas já foram encontradas (5). Colocando-se os dados da Tabela 1 em um gráfico de V_{\max}^{-1} versus concentração de etanol, onde V_{\max} é a velocidade de produção de CO_2

V_{\max}^{-1} é a velocidade em presença de diferentes concentrações do mesmo, obtém-se o gráfico da Figura 2, sendo que a inclinação da

Figura 2 - Gráfico da inibição não-competitiva pelo etanol na atividade fermentativa de *Saccharomyces cerevisiae* Y185, sendo V_{\max} a atividade fermentativa na ausência de etanol e V_{\max}^{-1} a mesma atividade em presença de diferentes concentrações de etanol. O inverso da inclinação da K_i

Tabela 1 - Atividade fermentativa ($Q\text{CO}_2$) de células de *Saccharomyces cerevisiae* Y185, suplementadas com ácido oleico e com ácido linoleico em presença de diferentes concentrações de etanol

Etolol [I] (mol)	Células com membranas enriquecidas em			
	ácido oleico		ácido linoleico	
	nmol CO_2 mg . min	% redução	nmol CO_2 mg . min	% redução
0	262	-	276	-
0,8	234	11	205	26
1,0	207	21	163	41
1,2	178	32	133	52
1,4	162	38	121	56
1,6	139	47	68	75



reta fornecerá o valor de $-Ki$. Confirma-se então a inibição não-competitiva do etanol sobre a atividade fermentativa, pois os pontos obtidos fornecem uma relação linear. Somente em concentrações mais altas de etanol (1,6M) é que vão aparecer desvios da reta. Nessa concentração a porcentagem de células viáveis cai rapidamente e este efeito é mais acentuado nas células suplementadas com ácido linoleico.

Os valores de Ki obtidos foram de $1,07 \pm 0,04$ M para células suplementadas com ácido oleico e de $0,74 \pm 0,09$ M para células suplementadas com ácido linoleico. Isto indica que o grau de insaturação da membrana tem papel importante na tolerância ao etanol pelas leveduras e que há um limite para essa insaturação. No caso das membranas com maior porcentagem de ácido linoleico, que apresenta duas insaturações na cadeia, há um aumento exagerado da fluidez das mesmas e a célula não teria mais capacidade de governar sua permeabilidade.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Michele Vitolo, por sugestões dadas.

À Encyclopaedia Britannica do Brasil que financiou a viagem de estudos que possibilitou este trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Aiba, S.; Shoda, M. & Nagatani, M. - Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng. (New York), 10:845-864, 1968.
2. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. - Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I - Ergosterol requirement for growth in a defined medium. J. Cell. Comp. Physiol. (Philadelphia), 41:23-36, 1953.
3. Andreasen, A.A. & Stier, T.J.B. - Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. II - Unsaturated fatty acid requirement for growth in a defined medium. J. Cell. Comp. Physiol. (Philadelphia), 43:271-281, 1954.
4. Beavan, M.J.; Charpentier, C. & Rose, A.H. - Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 431. J. Gen. Microbiol. (Elstree), 128:1447-1455, 1982.
5. Brown, S.W.; Oliver, S.G.; Harrison, D.E.F. & Righelato, R.C. - Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: differences in the magnitude and complexity of the effect. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (Berlin), 11:151-155, 1981.
6. Fink, H. & Kühles, R. - Beiträge zur methylenblaufärbung der Hefezellen und Studien über die Permeabilität der Hefezellmembran. II - Mitteilung. Eine verbesserte Farbelflüssigkeit zur Erkennung von Tötten Hefezellen. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. (Berlin), 218:65-66, 1933.
7. Gray, W.D. - Studies on the alcohol tolerance of yeasts. J. Bacteriol. (Baltimore), 42:561-574, 1941.
8. Holzberg, I.; Finn, R.K. & Steinkrans, K.H. - A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. Biotechnol. Bioeng. (New York), 9:413-427, 1967.
9. Thomas, S.D.; Hossak, J.A. & Rose, A.H. - Plasma membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. (Berlin), 117:239-245, 1978.
10. Troyer, J.R. - A relationship between cell multiplication and alcohol tolerance in yeasts. Mycologia (New York), 45:20-39, 1953.

FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DE CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR *ZYMOMONAS MOBILIS*

Eliana Flavia Camporese Sérvulo (Bolsista CNPq)
 & Francisca Pessoa de França (Bolsista CNPq)

Deptº de Engenharia Bioquímica
 Escola de Química UFRJ
 Centro de Tecnologia - Bloco E
 Ilha do Fundão
 21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Verificou-se o comportamento da bactéria *Zymomonas mobilis* CP3 em meio de fermentação, composto de caldo de cana-de-açúcar suplementado de nutrientes de acordo com a composição do meio Schreder modificado. O crescimento da bactéria foi proporcional à concentração inicial de substrato, entretanto, os melhores valores encontrados para fatores de rendimento e coeficientes molares foram obtidos quando se utilizou baixos teores de substrato. Os melhores resultados foram obtidos nas temperaturas de 25-30 e 35°C; em temperaturas superiores ou inferiores obteve-se menor produtividade em etanol e, paralelamente, menor consumo de substrato. A faixa de pH ótimo para produção de etanol foi entre 5,0 e 6,0; para os demais valores de pH estudados, observou-se uma diminuição dos parâmetros fermentativos.

Summary

Alcoholic fermentation from sugar cane juice by Zymomonas mobilis

The behavior of the bacteria *Zymomonas mobilis* was studied in a media containing cane juice and nutrients at the same composition of the modified Schreder media. The growth of the bacteria was proportional to the initial substrate concentrations, however, higher values of cell and molar growth yields were achieved using lower substrate concentrations. Ethanol productivity was higher at 25-30 and 35°C, being lower for temperatures values above or below this range. The optimum pH range for ethanol formation was found to be between 5,0 and 6,0; for the other initial pH values tested was observed a decrease of the fermentation parameters studied.

Introdução

As dificuldades que, por diversas razões foram impostas no campo energético, ao país, incentivaram pesquisas para se melhorar a produção de etanol por processos fermentativos.

Tradicionalmente, a fermentação alcoólica é promovida por leveduras; no entanto, é possível que seja conduzida por outros microrganismos, sendo um dos mais promissores as bactérias da espécie *Zymomonas mobilis*, pois crescem e fermentam rapidamente, produzindo etanol em quantidades semelhantes às obtidas por leveduras.

No intuito de estabelecer o comportamento de *Z. mobilis* e, consequentemente,

empregá-la como agente da fermentação alcoólica, alguns pesquisadores desenvolveram experiências utilizando meios sintéticos (6, 8, 10, 11, 15). Mas, para que o processo industrial seja considerado economicamente viável é necessária a utilização de matérias-primas de baixo custo e disponíveis em grandes quantidades, e entre as sacaríneas destacam-se melão e caldo de cana-de-açúcar, abundantes no Brasil.

O estudo da concentração inicial de células é de significativa importância, uma vez que este parâmetro influencia no tempo e na produtividade do processo fermentativo.

A temperatura também influi no metabolismo fermentativo, mas a maioria dos estudos metabólicos utilizando bactérias do gênero *Zymomonas* foram conduzidos a 30°C. Explicação provável reside no fato da temperatura ótima de crescimento destas bactérias estar entre 25 e 31°C (11). Entretanto, nem sempre a temperatura ótima de crescimento é também a ideal para o processo fermentativo.

Esses microrganismos apresentam uma extensa faixa de pH para crescimento, de 3,5 a 7,0, entretanto, devem existir valores ótimos para produção do etanol, considerando-se que pode ocorrer a formação de outras substâncias, tais como: ácido lático, acetona, ácido acético (19).

Material e Métodos

Microrganismo - Foi utilizada uma amostra de *Zymomonas mobilis*, cedida pelo Prof. José Otamar Falcão de Moraes, da Universidade Federal de Pernambuco. Esta bactéria foi isolada de "caldo-picado" (bebida popular do Nordeste), identificada e designada por CP3, pelo Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima, do Instituto de Antibióticos da UFPe.

Meios de cultura - Caldo de cana foi a matéria-prima utilizada no preparo de todos os meios empregados, adicionando-se sais de acordo com o meio Schreder modificado (4, 12).

Os meios de manutenção e inóculo constaram de caldo de cana clarificado com albumina de ovo, diluído de modo a apresentar concentração inicial de glicídios de 20 e 50g/l respectivamente, esterilizado a 0,5 atmosfera por 15 minutos.

O meio de fermentação constou de caldo de cana centrifugado a 8000 x g por 15 minutos e diluído de modo a apresentar em torno de 150g/l de glicídios totais.

Manutenção do microrganismo - O mesmo foi cultivado, semanalmente, em meio de manutenção e mantido a 5°C após incubação a 30°C por 16-18 horas.

Fermentação - Em todos os experimentos, as fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 1,0 litro, contendo 700ml de meio de fermentação esterilizado a 0,5atm/30 min, sendo realizadas, no mínimo, quatro bateladas. As condições variaram de acordo com os experimentos realizados.

Experimentos - Crescimento em função da concentração inicial de substrato - Sabe-se que para levedura, a concentração ideal de açúcar para produção de biomassa está em torno de 10g/l, quando o microrganismo desenvolve preferencialmente seu metabolismo energético máximo, em detrimento do metabolismo fermentativo. Para *Z. mobilis*, não foram encontrados dados a respeito; portanto, foi determinada a concentração de substrato que propiciasse melhor crescimento. Foram realizados experimentos variando no meio de fermentação a concentração de glicídios totais: 10; 20; 30; 40; 50; 50 e 100g/l. O inóculo foi de $1,5 \times 10^{-2}$ g/l, o pH inicial de 5,0 - 5,5 e a temperatura de 30±1°C.

Padronização do inóculo - A importância da determinação da concentração inicial de células reside no fato de sua influência no tempo de fermentação. Grandes volumes de inóculo reduzem esse tempo, e consequentemente, aumentam a produtividade em etanol. Foram testadas diferentes concentrações de células iniciais: 0,025; 0,050; 0,100; 0,200g/l.

Efeito da temperatura - Uma vez determinada a concentração de células a ser utilizada para inocular o meio de fermentação foram executados experimentos, cuja finalidade foi a de verificar em que temperatura a produção de etanol era máxima. Foi utilizado o meio de fermentação, com pH ajustado a 5,0 - 5,5 e inoculado com volume de células correspondente a uma concentração inicial de 1,0g/l. Incubações foram feitas em estufa a 20±1°C, 25±1°C; 30±1°C, 25±1°C; 40±1°C e 45±1°C.

Efeito do pH - Para esta série de experimentos, o meio teve seu pH ajustado, após esterilização, a 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 com solução de NaOH 1N ou HCl 2N. Foi usado como inóculo 0,1g de células iniciais por litro de meio. A temperatura de processo foi de 35°C, de acordo com os resultados do estudo precedente.

Determinações quantitativas - Quantificação celular - Feita através de uma curva de peso seco relacionado com absorbância a 340nm em Spectronic Bausch & Lomb. A absorbância de 0,3 correspondeu a 0,0422g de células por litro. Utilizou-se também a contagem direta em câmara Neubauer, usando-se as diluições que proporcionaram de 200-300 células por mm³.

Dosagem de açúcares - Foram usados dois métodos, o de Somogyi (18) e o "kit" Merck (Merckotest - glucose Methode God-Pap).

Dosagem de etanol - Pelo método do dicromato de potássio (5).

Determinação do pH - Em potenciómetro Merkblatt Metrohm Elektrodem.

Resultados e Discussão

O crescimento da bactéria foi proporcional à concentração de substrato na faixa de 10 a 100g/l. Nas concentrações de 50 e 100g/l as produções de biomassa foram muito próximas (Figura 1).

Os valores das velocidades específicas de crescimento, μ , apresentaram pequenas variações de 0,29 a 0,36 h⁻¹. Isto pode ser explicado, pelo fato de ter sido utilizado o mesmo meio para todos os experimentos, variando-se apenas a concentração inicial de substrato em determinada faixa.

Trabalhos utilizando diversas cepas de *Z. mobilis*, em várias concentrações de substratos e em processo de batelada ou contínuo, apresentam valores de μ , que se encontram na faixa de 0,10 a 0,41 h⁻¹ (7, 8, 9, 10, 14).

Os rendimentos celulares, $Y_{X/S}$, variaram de 0,009 a 0,024g/g e encontram-se na Tabela 1.

Lee & col. (8), trabalhando com *Z. mobilis* ATCC 10988 em processo contínuo, usando meio de cultura contendo 100 e 150g de glicose por litro, obtiveram os rendimentos de crescimento respectivos de 0,0029 e 0,027g/g.

Rogers & col. (14) utilizando também *Z. mobilis* ATCC 10988 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602 apresentaram valores de $Y_{X/S}$ de 0,019 e 0,033g/g respectivamente, para um processo de batelada com concentração de glicose de 250g/l, temperatura de 30°C e pH 5,0.

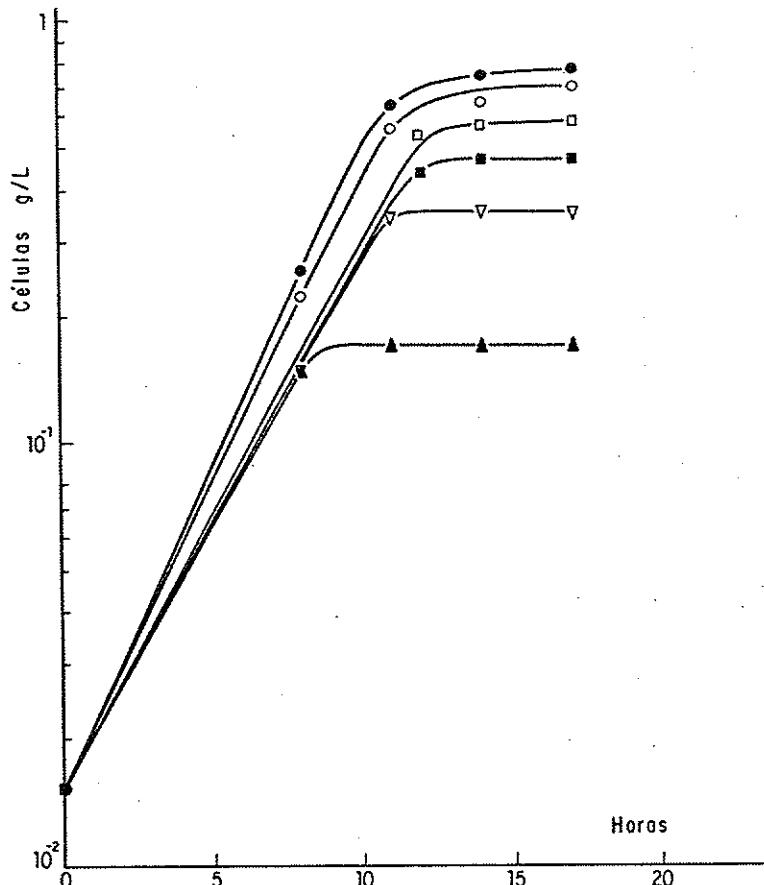
O rendimento celular obtido para *Z. mobilis* CP3 foi muito pequeno para o meio de cultura contendo 100g de glicídios totais por litro em relação às demais concentrações. Lyness & Doelle (11) obtiveram também valores baixos para $Y_{X/S}$, que variaram de 0,0062 a 0,0093/g, para duas amostras de *Z. mobilis*, Z7 e Z10, cultivadas em meio sintético contendo um teor de sacarose de 200g/l a 35°C.

De acordo com alguns autores (2, 10) a redução do rendimento em biomassa, em meio contendo sacarose quando comparado com o crescimento em meio contendo glicose, é devida à formação de levana.

Os valores do coeficiente molar de crescimento em relação à sacarose, Y_S , expresso em g (peso seco) de bactéria por mol de substrato consumido, apresentados na Tabela 1, foram inversamente proporcionais ao aumento da concentração de substrato inicial.

Segundo trabalhos publicados (1, 2), os Y_S variaram de 3,48 a 9,32, para

Figura 1 - Cinética do crescimento de *Zymomonas mobilis* CP3 em função da concentração inicial de substrato.
Símbolos: $\blacktriangle = 10\text{g/l}$; $\nabla = 20\text{g/l}$; $\blacksquare = 30\text{g/l}$; $\square = 40\text{g/l}$; $\circ = 50\text{g/l}$; $\bullet = 100\text{g/l}$ de glicídios totais no meio de inóculo - M^2



diferentes amostras de *Z. mobilis* e condições diferentes de experimentos.

Embora os rendimentos celulares bem como os coeficientes molares de crescimento, para *Z. mobilis* CP3, tenham sido maiores quando se usou menores teores de substrato, sugere-se a concentração inicial de 50g/l, visto a biomassa formada ter sido maior, facilitando assim o preparo do inóculo.

Os resultados apresentados na Tabela 2, mostram que nas condições, ensaiadas, a concentração inicial de células influiu no andamento da fermentação. O inóculo inicial

Tabela 1 - Crescimento de *Zymomonas mobilis* CP3 em função da concentração inicial de substrato.

Símbolos: $Y_{X/S}$ = Rendimento celular; Y_S = Coeficiente molar de crescimento em relação à sacarose; μ = Velocidade específica de crescimento

Glicídios iniciais (g/l)	Glicídios consumidos (g/l)	Células (g/l)	$Y_{X/S}$ (g/g)	Y_S	μ (h^{-1})
10	8,5	0,17	0,020	6,84	0,29
20	17,6	0,35	0,020	6,80	0,29
30	26,9	0,47	0,017	5,98	0,29
40	35,9	0,58	0,016	5,53	0,30
50	44,9	0,71	0,016	5,41	0,32
100	86,5	0,77	0,009	3,04	0,36

Tabela 2 - Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP3 em função da concentração de inóculo inicial.

Símbolos: m = Mol; E = Etanol; S = Sacarose; a = Média de quatro experimentos; b = Desvio padrão da média

Células iniciais por litro	Tempo de fermentação (h)	16			24				
		Glicídios iniciais	Glicídios finais (g/l)	Etanol (g/l)	mE/mS	Glicídios finais (g/l)	Etanol (g/l)		
		g	nº x 10 ⁷	(a)	(b)				
0,025	3,3	154,0	± 4,0	45,3 ± 10,1	39,0 ± 1,2	2,7 ± 0,1	27,1 ± 1,1	54,5 ± 0,3	3,1 ± 0,1
0,050	6,2	154,0	± 4,0	33,2 ± 7,9	43,9 ± 2,1	2,8 ± 0,1	25,2 ± 2,9	52,7 ± 2,6	2,9 ± 0,2
0,100	12,4	152,0	± 1,7	21,9 ± 0,5	52,5 ± 2,4	3,0 ± 0,2	21,6 ± 0,5	53,3 ± 0,3	3,0 ± 0,2
0,200	22,1	150,0	± 0,6	23,1 ± 0,2	53,7 ± 0,9	3,1 ± 0,1	23,4 ± 0,9	54,1 ± 1,1	3,1 ± 0,3

não aumentou o teor de etanol formado, entretanto, influenciou no tempo de processo. Para os inóculos de 0,1 e 0,2g/l, o processo fermentativo atingiu o final com 16 horas, entretanto, para inóculos menores o tempo de processo foi maior.

A relação entre etanol formado e substrato consumido foi praticamente a mesma, considerando-se os desvios.

Na literatura disponível não há nenhum estudo que apresente a influência da concentração inicial de células, para o gênero *Zymomonas* na fermentação alcoólica. Porém vários trabalhos, utilizando como agente de fermentação leveduras, geralmente *Saccharomyces cerevisiae*, indicam que ocorre redução do tempo de fermentação com o aumento da massa de células inoculada (3, 16).

Não foi do nosso interesse obter "fermentações rápidas", mas sim o de utilizar um tempo de processo adequado e 16 horas mostrou ser um tempo satisfatório para o estudo do comportamento de *Z. mobilis* na fermentação alcoólica. Os resultados obtidos não apresentaram variação significativa para 0,1 e 0,2g de células iniciais por litro, quando foram obtidos maiores teores de etanol com 16 horas de fermentação, por isso, os experimentos posteriores foram realizados utilizando como inóculo 0,1g/l de células.

Verificou-se que nas temperaturas de 20; 40 e 45°C ocorreu menor produção de etanol e paralelamente menor consumo de substrato. Na faixa de 25 a 35°C os teores de álcool formado foram praticamente os mesmos, entretanto, a 25°C o microrganismo utilizou maior quantidade de sacarose. Provavelmente, nesta temperatura parte da sacarose foi utilizada em outra via metabólica ou então na formação de levana, pois segundo Skotnicki & col. (17) a formação de levana diminui com o aumento da temperatura. Observou-se também, que entre 20 e 35°C a relação mol de etanol por mol de sacarose foi proporcional ao aumento da temperatura (Figura 2).

Lyness & Doelle (11) também observaram variação na produção de etanol em função da temperatura quando utilizaram faixa de 30 a 42,5°C: os teores de etanol obtidos utilizando meio com 200g/l de sacarose, foram em média de 69,5g/l para *Z. mobilis* Z7 e 66,1g/l para *Z. mobilis* Z10 em temperaturas de 35-37°C.

Skotnicki & col. (17) trabalhando com várias amostras de *Z. mobilis*, verificaram que na temperatura de 37°C, a produção de etanol foi menor do que a 30°C, apresentando concentração de 56 e 38g/l, num meio sintético contendo 200g de sacarose por litro quando incubado a 30 e 37°C, respectivamente.

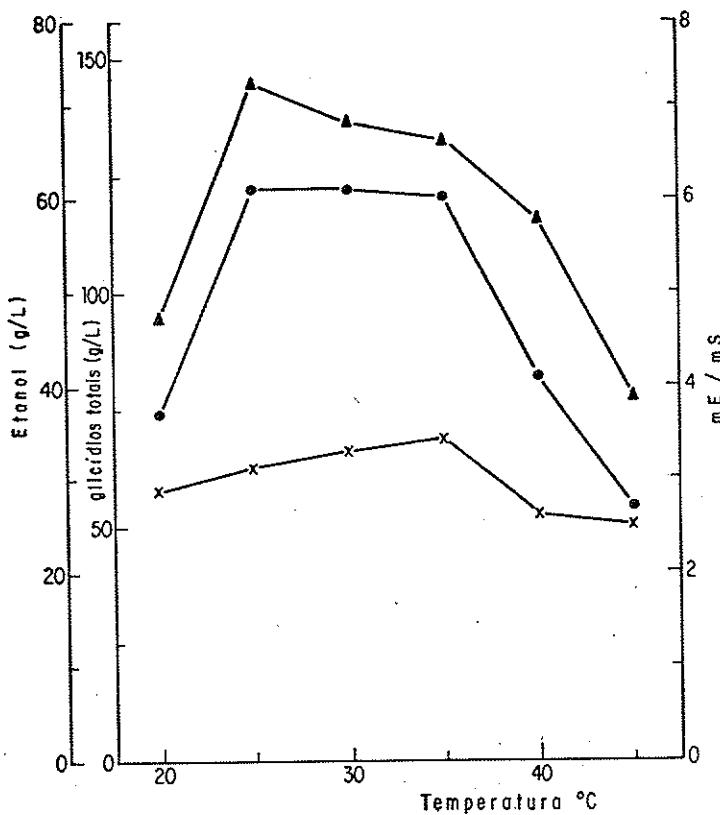
Van Vuuren & Meyer (20) trabalhando com *Z. mobilis* ATCC 10988, verificaram ser 32°C a temperatura ideal para produção de etanol a partir de melão de cana, com meio contendo concentração inicial de substrato de 100g/l; temperaturas superiores causaram variação significativa na formação de etanol.

As relações entre mol de etanol e mol de sacarose também variaram em função da temperatura. A relação máxima foi observada quando a temperatura de processo foi de 35°C (Figura 2).

Além disso, considerando que em processos industriais é importante reduzir os gastos, o emprego de temperaturas mais altas na fermentação desde que próximas à

Figura 2 - Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP3' em função da temperatura.

Símbolos: ● = Produção de etanol; ▲ = Consumo de glicídios totais; X = Mol de etanol por mol de sacarose



temperatura local, minimiza o consumo de energia na refrigeração bem como na destilação (13).

A faixa de pH ótimo para produção de etanol foi entre 5,0 e 6,0 (Tabela 3). Este fato foi também observado por Kosaric & col. (6) para *Z. anaerobia* ATCC 29501.

Tabela 3 - Produção de etanol por *Zymomonas mobilis* CP3 em função do pH após 16 horas de cultivo a 35°C, com concentração inicial de células de 0,1g/l.

Símbolos: G_0 = Glicídios iniciais; G = Glicídios finais; E = Etanol; m = Mol; $Y_{p/s}$ = Rendimento; P = Produtividade; a = Média de quatro experimentos; b = Desvio padrão da média

pH inicial	G_0 (g/l)	G (g/l)	E (g/l)	mE/mS	$Y_{p/s}$ (g/g)	pH final	P (g/l.h)
3,0	157,0	149,5 ± 4,1	0,7 ± 0,5	0,7 ± 0,2	0,10 ± 0,03	2,90 ^(a) ± 0,05 ^(b)	0,1 ± 0,1
4,0	150,0	96,5 ± 9,9	17,8 ± 3,5	2,5 ± 0,3	0,33 ± 0,03	3,75 ± 0,05	1,1 ± 0,2
5,0	150,0	17,1 ± 0,1	60,0 ± 0,1	3,4 ± 0,1	0,45 ± 0,01	4,35 ± 0,05	3,8 ± 0,1
6,0	158,0	18,7 ± 2,4	59,9 ± 3,0	3,2 ± 0,1	0,43 ± 0,02	4,55 ± 0,05	3,7 ± 0,2
7,0	158,0	15,1 ± 1,5	57,4 ± 0,8	3,0 ± 0,1	0,40 ± 0,01	5,05 ± 0,05	3,6 ± 0,1
8,0	150,0	49,4 ± 1,4	29,0 ± 1,3	2,1 ± 0,2	0,28 ± 0,03	5,00 ± 0,10	1,8 ± 0,5

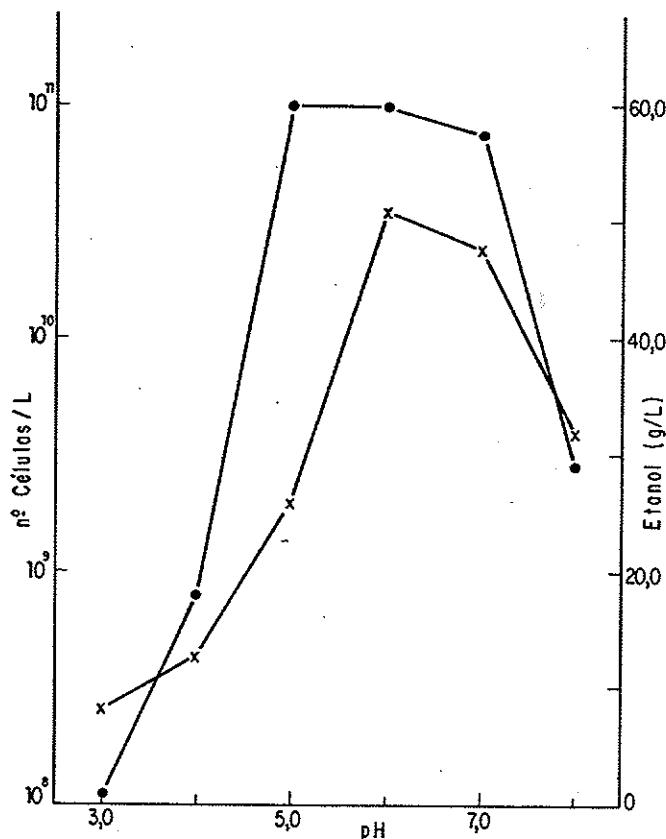
Quando o pH do meio de fermentação foi ajustado em 3,0 praticamente não houve produção de etanol, o consumo de açúcar foi mínimo, assim como o crescimento. Estes resultados estão de acordo com Swings (19). Sabe-se que para as leveduras, quando o pH do meio atinge valores iguais ou inferiores a 3,0 a fermentação cessa, porque este valor é incompatível com o crescimento do microrganismo; o mesmo foi observado para *Z. mobilis* CP3.

O valor do pH final baixou sensivelmente, só não sendo muito significativo para o pH inicial de 3,0. O abaixamento do pH no meio fermentado pode ser devido ao fato de que o microrganismo consumiu o íon NH_4^+ em maior velocidade que o íon SO_4^{2-} ; este em excesso, reage formando ácidos, acarretando redução do pH. Outra explicação, seria a formação de pequenas quantidades de ácido lático, um dos subprodutos da fermentação de açúcares por *Zymomonas*.

Os meios de fermentação com pH iniciais ajustados em 6,0, 7,0 e 8,0 apresentaram concentrações em biomassa superiores à obtida para pH inicial de 5,0; sendo uma explicação provável o fato de que naqueles valores o pH durante o processo não atingiu valores inferiores a 4,5 (Figura 3).

Figura 3 – Produção de etanol e crescimento de *Zymomonas mobilis* CP3 em diferentes valores de pH.

Símbolos: X = Células; • = Etanol. Número de células inicial/l = $3,6 \times 10^8$



Swings & De Ley (19) testando o comportamento de 38 cepas de sua coleção frente a diferentes valores iniciais de pH constataram ser a faixa de pH entre 5,0 e 7,0

ideal para crescimento, e que em pH 8,0 não houve crescimento. A cepa *Z. mobilis* CP3 utilizada neste trabalho comportou-se diferentemente no que tange ao pH 8,0, pois a esse nível ainda se multiplicou.

O trabalho realizado por Van Vuuren & Meyer (20) apresenta o efeito do pH para amostras de *Zymomonas* na produção de etanol em meio de melão de cana. Dentre a série de valores de pH por eles testados, uma amostra de *Z. mobilis* ATCC 10988, apresentou pH ótimo em torno de 5,7 enquanto as demais amostras entre 5,0 e 5,6 aproximadamente. Em ensaios realizados com a primeira, obtiveram concentração de etanol de cerca de 46g/l num meio de melão contendo 100g/l de açúcares, sendo este o melhor resultado.

Neste trabalho, os valores de pH iniciais de 5,0 e 6,0 foram os que apresentaram melhores resultados para concentração de etanol e produtividade.

Referências Bibliográficas

- Bauchop, T. & Elsden, S.D. - The growth of microorganisms in relation to their energy supply. *J. Gen. Microbiol.*, 23:457-469, 1960.
- Dawes, E.A.; Ribbons, D.W. & Rees, D.A. - Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*: formation of a levan. *Biochem. J.*, 98:804-812, 1966.
- Falcone, M.; Borzani, W. & Vairo, M.L.R. - Influência da concentração inicial de leveduras no tempo e no rendimento da fermentação alcoólica de mosto de melão. I - Inoculação do mosto com fermento prensado. *An. Farm. Quim. SP.*, 12:77-83, 1961.
- Gonçalves de Lima, O.; Larios, C. & Azcarate, E. - Aislamiento y estudio de nuevas cepas de *Pseudomonas Lindneri*, Kluyver et Hoppenbrouwers (*Termobacterium mobile* Lindner) en aguamieles de la Meseta Central Mexicana. *Ciencia* (México City), 11:273-277, 1951.
- Guymon, J.F. & Crowell, E.A. - The chemical determination of alcohol in wines and stillage by dichromate. *J. Assoc. Off. Agric. Chem. (Baltimore)*, 42:393-394, 1959.
- Kosaric, N.; Ong, S.L. & Duvnjak, Z. - Fuel alcohol biosynthesis by *Zymomonas anaerobia*: optimization studies. *Biotechnol. Bioeng.*, 24:691-701, 1982.
- Lavers, B.H.; Pang, P.; Mackenzie, C.R.; Lawford, G.R.; Pik, J.R. & Lawford, H.G. - Industrial alcohol production by high performance bacterial fermentation. *Adv. Biotechnol.*, 2:195-200, 1981.
- Lee, K.J.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - Ethanol production by *Zymomonas mobilis* in continuous culture at high glucose concentrations. *Biotechnol. Lett.*, 1:421-426, 1979.
- Lee, K.J.; Skotnicki, M.L.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - Kinetic studies on a highly productive strain of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 2:339-344, 1980.
- Lee, K.J.; Skotnicki, M.L.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - The kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* on fructose and sucrose media. *Biotechnol. Lett.*, 3:207-212, 1981.
- Lyness, E. & Doelle, H.W. - Effect of temperature on sucrose to ethanol conversion by *Zymomonas mobilis* strains. *Biotechnol. Lett.*, 2:549-554, 1980.
- Magalhães Neto, B.; Gonçalves de Lima, O.; Almeida, A.M. de & Morais, J.O. de - A utilização de carboidratos e outras substâncias nutritivas por *Zymomonas mobilis* (=*Pseudomonas lindneri*), cepa Ag 11 isolada em 1951. *An. Esc. Super. Quim. (Recife)*, 1:83-88, 1959.
- Pincus, R.; Chase Jr., T.; Eveleigh, D.H. & Montenecourt, B.S. - Production of ethanol by *Zymomonas mobilis*. New Brunswick, Cook Coll., Rutgers Univ., 80th Annual Meeting, May 11-16, 1980.
- Rogers, P.L.; Lee, K.J. & Tribe, D.E. - High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. *Process Biochem.*, 15:7-11, 1980.
- Rogers, P.L.; Lee, K.J. & Tribe, D.E. - Kinetics of alcohol production by *Zymomonas mobilis* at high sugar concentrations. *Biotechnol. Lett.*, 1:165-170, 1979.
- Rosário, E.J.; Lee, K.J. & Rogers, P.L. - Kinetics of alcohol fermentation at

- high yeast levels. Biotechnol. Bioeng., 21:1447-1482, 1979.
- 17. Skotnicki, M.L.; Lee, K.J.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. Appl. Env. Microbiol., 41:889-893, 1981.
 - 18. Somogyi, M. - Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195:19-23, 1952.
 - 19. Swings, J. & De Ley, J. - The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev., 41:1-46, 1977.
 - 20. Van Vuuren, H.J.J. & Meyer, L. - Production of ethanol from sugar cane molasses by *Zymomonas mobilis*. Biotechnol. Lett., 4:253:256, 1952.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

ASM News, p.239, 1986.

O LAPP (Latin American Professorship Program) já aprovou para os anos de 86 e 87 a realização de cursos no Brasil, Peru e Argentina. As datas estão sujeitas a confirmação ou alteração. Maiores informações com os coordenadores locais dos cursos, relacionados abaixo:

Fisiologia e genética de Thiobacillus - De 12 a 22 de agosto de 1986, Universidade Caetano Heredia, Peru.

Ministrado por Olli Tuovinen, Universidade do Estado de Ohio, USA. Coordenação local: José L. Bauer, Deptº de Microbiologia, Apartado 5045, Lima Peru. (Curso já realizado).

Tecnologia microbiana de bactérias ácido-láticas - Setembro a Outubro de 1986, CERLA Laboratory, Argentina. Coordenação local: Guillermo Oliver, Chacabuco 145, Tucuman 4000, Argentina. (Curso já realizado).

Adaptações biológicas ao parasitismo - De 9 a 20 de março de 1987, Universidade Federal da Bahia, Salvador BA.

Ministrado por Gerhard A. Schard, Universidade de Pennsylvania. Coordenador local: Maria E. Bavia, Escola de Medicina Veterinária, Caixa Postal 7858, Salvador BA, Brasil.

Isolamento, purificação e caracterização de抗ígenos fúngicos - Verão de 1987 (data a ser confirmada), São Paulo SP.

Ministrado por Garry T. Cole, Universidade do Texas. Coordenação local: Luiz R. Travassos, Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu 862, 04023 São Paulo SP, Brasil.

Taxonomia e biologia de micorriza - Início de 1987 (data a ser confirmada), CPRN Instituto de Botânica, São Paulo SP.

Ministrado por James Trappe, Departamento Nacional de Agricultura dos EUA, Laboratório de Ciências Florestais. Coordenação local: Vera L.R. Bononi, Instituto de Botânica, Caixa Postal 4005, 01051 São Paulo SP, Brasil.

Imunologia das infecções parasíticas - 1987 (data a ser confirmada), Universidade Estadual Paulista de Botucatu, Botucatu SP.

Ministrado por Jay Farrell, Escola de Medicina Veterinária, Universidade de Pennsylvania. Coordenação local: Norma G.S. Mota, Deptº de Microbiologia e Imunologia, Universidade Estadual Paulista, 18600 Botucatu SP, Brasil.

A natureza do programa LAPP, bem como seus objetivos, estão publicados em Informações Técnico-Científicas da Revista de Microbiologia, 17(1):86-87, 1986.

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

Bibliografia Brasileira de Ciências Ambientais. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia, vol. 1, 116p., 1983.

Trata-se do volume 2 da Bibliografia Brasileira de Ciências Ambientais, editada Rev. Microbiol., São Paulo, 17(4):385-392, Out./Dez. 1986.

pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, e tem por objetivo facilitar o acesso a informações e documentos na área de ciências ambientais.

Este volume indexa 1027 referências publicadas no Brasil no período de 1970 a 1981 (incluindo literatura gerada no exterior e publicada no Brasil), pertinentes a área de ciências ambientais incluindo: ecologia animal e vegetal, recursos naturais, zoologia, botânica, poluição, conservacionismo, política e educação ambiental.

Os trabalhos contidos nesta bibliografia incluem monografias, artigos de periódicos, livros, trabalhos apresentados em congressos, seminários, etc., e podem ser obtidos através da Biblioteca Setorial do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite s/nº 90000 Porto Alegre, RS.

Petra S. Sanchez

Cetesb

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

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology – Structures of DNA (part 1/2).
New York, Cold Spring Harbor Laboratory, vol. 47, 1982.

Dois avançados volumes para quem se interessa sobre a estrutura da dupla hélice do DNA e de como esta pode ser lida. Existem dois tipos de informação genética contidos na hélice do DNA: a sequência de nucleotídeos, que especifica a sequência de aminoácidos numa proteína, e as instruções para expressão seletiva de determinadas sequências e não outras. É sobre este último tipo de informação dos trabalhos contidos em *Structures of DNA* versa. Naturalmente, há grande quantidade de informações (e especulações) sobre o Z-DNA ("left-handed") e seu papel em plasmar a "informação conformacional" do material genético. Mas, além das análises estruturais, sobre o DNA, há um material de primeira ordem sobre interações DNA-proteína, natureza dos nucleossomos, metilação do DNA e controle da expressão gênica, replicação do DNA viral, regulação da transcrição de genes de eucariotos em diferentes veículos e, como seria de se esperar, um capítulo especialmente dedicado a girases e topoisomerases.

Diversas inovações técnicas são apresentadas, principalmente na seção dedicada à análise conformacional do DNA. Aqui vale notar o trabalho de D.C. Schwartz & col., do grupo de Charles Cantor (Deptº de Genética Humana da Columbia University), sobre técnicas para purificar moléculas de DNA de grande tamanho. É a primeira vez que se apresenta a técnica eletroforética de "pulse-field", onde o DNA é corrido num gel "submarino" submetido a pulsos elétricos alternados: norte-sul e leste-oeste. Esse trabalho, verdadeiramente seminal, do grupo de C. Cantor é que deu origem ao estudo dos cromossomos de protozoários e leveduras por técnicas eletroforéticas baseadas na alternância de campo (ver, por exemplo, *Science*, 229:658, 1985).

Em resumo, *Structures of DNA* apresenta uma excelente visão sobre a natureza química do DNA, principalmente graças ao enfoque multidisciplinar garantido pelo Simpósio de Cold Spring Harbor.

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

Focus, 7(4):1-15, 1985.

A revista Focus é publicada em inglês, como um serviço ao biólogo molecular, pelos Laboratórios Bethesda Research, de Maryland, EUA. O número 4 do volume 7

contém vários artigos de interesse para todos os profissionais que trabalham em biologia molecular e biotecnologia. Entre esses artigos, podemos destacar o artigo de autoria de J.A. Zeugin e J.L. Hartley, sobre "Precipitação do DNA através de etanol" e dois artigos sobre o uso de probes biotiniladas para titulação de m-RNA e para detecção de sequências de DNA *in situ*, de autoria respectivamente de H. Seyfert e de L. Manuellidis.

A revista contém ainda seções regulares, como a seção "Ferramentas para o biólogo molecular", onde são apresentadas novas enzimas de restrição, vetores para clonagem molecular e kits para biologia molecular, de fabricação deste Laboratório, com especificações técnicas sobre esses produtos. Outra seção regular, intitulada "Fragmentos", contém também informações sobre produtos e técnicas, como técnicas imunocitoquímicas e biotinilação de proteínas e ácidos nucleicos. A seção sobre detecção de DNA contém informações sobre padrões para análise de RNA em corridas eletroforéticas e sobre síntese de RNA biotinilado. A revista conta ainda com uma seção de anúncios, onde são relacionados os principais simpósios, encontros e cursos, a serem realizados nos Estados Unidos, sobre temas relacionados à biologia molecular e à biotecnologia.

Sendo uma revista direcionada para a biologia molecular, é de grande interesse para atualização de metodologias e produtos de fabricação dos Laboratórios Bethesda Research, nessa área.

Maria Lucia Racz
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP

Fraenkel-Conrat, H. & Wagner, R.R. - *Comprehensive virology*. Vol. 19 - *Viral citopathology*. New York, Plenum Press, 536p., 1984. US\$ 69.50.

Este livro é o 19º volume e último da série *Comprehensive Virology*, da Plenum Press, editada por Heinz Fraenkel-Conrat e Robert R. Wagner. Esta série que compreende ao redor de 6000 páginas num total de 19 volumes, representa o esforço de um grande grupo de pesquisadores em analisar e relatar conhecimentos relativos a víruses, que se encontram normalmente publicados separadamente. Este fato é de grande importância pois permite que estes livros se tornem uma fonte de referências para estudantes de diferentes níveis como ainda para os pesquisadores desta área.

Este livro consta de 10 capítulos, sendo cada capítulo escrito por um ou mais especialistas que apresentam o conteúdo de uma forma didática, e principalmente, atualizada e com inúmeras referências bibliográficas.

O livro se preocupa com o estudo das bases moleculares da citopatogenicidade viral, havendo um capítulo introdutório sobre os efeitos citopáticos dos vírus, seguindo-se dois capítulos sobre a transcrição e tradução em células de mamíferos não infectadas. Os capítulos seguintes referem-se à análise dos mecanismos pelos quais os vírus, picorna, rabdo, adeno, herpes, pox, reo e toga, alteram a síntese molecular da célula hospedeira levando à morte celular.

Ignez Koseki
& Tauba Gitla Abuhab
Seção de Biologia Celular
Instituto Biológico
Caixa Postal 7119
01051 São Paulo SP

Haynes, B.F. & Eisenbarth, G.S., eds. - *Monoclonal antibodies: probes for the study of autoimmunity and immunodeficiency*. New York, Academic Press, 318p., 1983. US\$ 49.50.

Este manual pode ser visto como uma atualização na área de imunologia. Mostra a aplicação dos anticorpos monoclonais no estudo das imunodeficiências e na

autoimunidade.

É composto de 14 capítulos escritos por pesquisadores de diferentes centros de estudo.

No 1º capítulo, Morimoto, Schlossman e Reinhertz apresentam uma revisão sobre a diferenciação de células T, função das subpopulações das células T, definidas pelos anticorpos monoclonais e o seu envolvimento em algumas doenças, onde existe uma disfunção da célula T.

No 2º capítulo, é descrito por Torok-Storb, Martin e Hansen, uma série de reagentes monoclonais, utilizados para definir os diferentes marcadores de célula hematopoética, com especial enfoque no uso de anticorpos monoclonais em transplante de medula óssea.

Considerando a importância do timo na educação de células T normais, o estudo endócrino do timo é crítico na compreensão das desordens da imunoregulação e da imunodeficiência, sendo apresentado no 3º capítulo por Haynes e Eisenbarth novos抗igenos de superfície do timo.

Morrissey e Singer, discutem no 4º capítulo o papel do espaço pré-térmico e intra-térmico no reconhecimento do não próprio, ou seja a educação da célula T na tolerância à抗igenos estranhos.

No capítulo 5, H. Buckley mostra o comportamento dos anticorpos monoclonais da série OKT, em pacientes com síndrome de imunodeficiência.

Bach, descreve o抗igeno HNK-1, como um抗igeno de diferenciação em linfócito granulares com função de células NK, no 6º capítulo.

Os抗igenos presentes na superfície de células B é demonstrado por Le Bien e Kersey, no 7º capítulo, através da utilização de anticorpos monoclonais, denominados BA-1, BA-2, BA-3.

Fauci e Lane, mostram o estudo da ativação da célula B, através do uso de heterocíbridomas murino-humano.

A produção de autoanticorpos é descrita no 9º capítulo por Pisetsky e no 10º capítulo é apresentada uma revisão por Evans e Engleman, sobre a diferenciação da célula T, mostrando a natureza molecular do receptor da célula T.

As doenças endócrinas são estudadas nos últimos 4 capítulos, sendo que o Diabetes Mellitus I, é apresentado por Eisenbarth, Jackson e Srikanta; Kohn & col., apresentam doenças autoimunes da tireoide e o estudo do receptor da tireotropina. Lindstrom, apresenta a ação do anticorpo anti-receptor da acetilcolina na patogênese da miastenia grave.

Harden e Haynes, descrevem a diferenciação intratímica da célula T, na miastenia grave.

Em resumo, este livro apresenta a utilização dos anticorpos monoclonais, quer a nível de pesquisa ou na aplicação clínica, contendo informações necessárias ao pesquisador e ao médico clínico.

Luiza Guilherme
Laboratório de Imunologia de
Transplantes
Instituto do Coração FMUSP
Av. Dr. Arnaldo, 455/3º
01246 São Paulo SP

Hybridoma, 3(3):201-303, ed. Mary Ann Liebert, 1984. US\$ 138.00/4 issues.

Revista especialmente dedicada à publicação de trabalhos descrevendo a caracterização de抗igenos por anticorpos monoclonais. São também aceitas contribuições relativas à aplicação de anticorpos monoclonais para diagnóstico e terapia, bem como notas sobre a tecnologia de hibridomas, incluindo os de células T.

Examinamos, para efeito desta resenha, o volume 3, número 3 (outono de 1984). A

maior parte dos trabalhos publicados se refere à caracterização de antígenos por anticorpos monoclonais, aparecendo algumas contribuições de caráter puramente técnico sobre cultivo e propagação de hibridomas. A julgar por essa amostra, a revista apela principalmente para quem estiver diretamente empenhado na obtenção de anticorpos monoclonais e, portanto, interessado em detalhes técnicos e metodológicos. Por outro lado, é preciso notar que esse mesmo tipo de informação já aparece regularmente nas páginas do Journal of Immunological Methods, e com frequência quatro vezes superior à de Hybridoma.

Carlos A. Moreira-Filho
 Deptº de Imunologia
 Instituto de Ciências Biomédicas USP
 Ed. Biomédicas III
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

Informativo do Instituto Butantan (S. Paulo), 12:1-4, 1985.

O informativo é uma publicação que divulga as atividades técnicas e científicas do Instituto Butantan de São Paulo.

Neste número são relatados dois artigos, sendo o primeiro sobre a quarta expedição de técnicos à Ilha da Queimada Grande para estudar o comportamento do *Bothrops insularis* e o segundo, da autoria de Sueli Blanes Damy sobre criação de animais de laboratório.

O boletim informa também sobre as palestras e cursos realizados no período setembro-outubro de 1985.

As palestras proferidas abrangeram diversas temáticas, como a proferida pela Dra. Charlotte Ownby da Universidade de Oklahoma que falou sobre avanços no tratamento de acidentes ofídicos. A Dra. Ida Sano Martins, do Serviço de Fisiopatologia falou a respeito de aspectos citomorfológicos e fisiológicos de trombócitos de serpentes. A outra palestra foi proferida pelo Dr. Rosalvo Guidolin sobre o tema "Macrófagos e imunopotencialização por adjuvantes".

Os cursos realizados foram sobre "Imunoenzimática" e o outro sobre "Animais peçonhentos".

Para adquirir o informativo, escrever para a Divisão de Extensão Cultural do Instituto Butantan, Av. Vital Brasil, 1500, 05504 São Paulo SP.

Roberto Mitio Yanaguita
 Deptº de Microbiologia ICB/USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 05508 São Paulo SP

Matthews, D.E. & Farewell, V.T. - Using and understanding medical statistics. Suisse, S. Karger, 200p., 1985. US\$ 28.75.

O presente livro, dos professores Matthews (Deptº de Estatística da Universidade de Waterloo em Ontário, no Canadá) e Farewell (Deptº de Bioestatística da Universidade de Washington, nos Estados Unidos), foi baseado num curso introdutório ministrado pelos autores a pesquisadores médicos do Centro Fred Hutchinson de Pesquisas em Câncer e tem por finalidade descrever os métodos estatísticos comumente encontrados em publicações de pesquisa científica médica. Em 15 capítulos os autores abordam os seguintes assuntos: conceitos básicos (variáveis aleatórias, distribuições de probabilidade e características de uma distribuição), testes de significância, teste exato de Fisher, testes aproximados para tabelas de contingência, precauções em relação a tabelas de contingência, curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier, comparação de curvas de sobrevivência, introdução à

distribuição normal, modelos de regressão linear para dados médicos, regressão logística binária, regressão proporcional à frequência de insucessos, análise de dados, planejamento experimental de testes clínicos, tamanho amostral.

Os tópicos são tratados de uma maneira clara e didática e totalmente desprovida de qualquer formalismo matemático, o que torna a leitura do livro acessível para uma gama grande de interessados no assunto, sem a formação matemática para o acompanhamento do assunto como é exposto geralmente na maioria dos livros-texto.

Os métodos discutidos pelos autores são fartamente ilustrados através de inúmeros exemplos de aplicação numérica, a maioria dos quais retirados de pesquisas médicas concretas.

Uma ênfase muito especial é dada, no entanto, aos métodos estatísticos empregados no estudo de doenças crônicas (três dos quinze capítulos do livro atêm-se exclusivamente ao estudo desses tópicos), fato que limitará o círculo de leitores da obra, apesar dos méritos que tratamos de assinalar acima.

Paulo Alberto Otto
Instituto de Biociências USP
Caixa Postal 11461
05499 São Paulo SP

Noticiário Embrapa - Aprenda a inocular sementes de ervilha, 135(1/2):1-2, 1986.

Uma solução para evitar o uso de adubos nitrogenados em culturas de ervilha foi apontada pelos pesquisadores do Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados (Embrapa - CPAC).

O processo alternativo consiste em se inocular sementes de ervilha aderidas com açúcar e bactérias nodulantes, fixadoras de N₂ do gênero *Rhizobium*, adequadamente selecionadas.

Esta técnica, além de simples, reduz os custos de nove vezes em relação aos adubos e pode ser aplicada a qualquer variedade de ervilha. Para realizá-la, alguns cuidados devem ser tomados: as bactérias devem estar viáveis, isto é, o prazo de validade do inoculante não deve estar vencido e o armazenamento deste deve ocorrer em lugar fresco. As sementes inoculadas com bactérias não devem ser expostas ao sol, nem a altas temperaturas e não devem ser tratadas com produtos químicos prejudiciais antes ou após a inoculação.

Heloisa Ramos Barbosa
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Pick, E., ed. - Lymphokines: a forum for immunoregulatory cell products. Vol. 3 - Lymphokines in macrophage activation. New York, Academic Press, vol.3, 450p., 1981. US\$ 65.00.

Apesar deste livro ser de 1981 e portanto seu conteúdo já estar defasado em 5 anos dos conhecimentos atuais, ele é um excelente texto. O título Linfoquinas; um forum sobre produtos celulares imunoreguladores leva o leitor a acreditar que se trata de uma ampla e extensa revisão dos produtos (não anticorpos) secretados por linfócitos e de sua ação sobre todas as células, imunes e não imunes, que fazem parte da resposta do hospedeiro frente a um antígeno estranho, e sobre as células hemopoiéticas (fator estimulador de colônias in vitro). Realmente o livro, como o subtítulo nas folhas internas indica, somente se refere ao papel das linfoquinas na ativação dos macrófagos. É o terceiro volume desta série e o primeiro a centralizar toda a informação na ativação dos macrófagos, aliás um dos primeiros a reunir tanta

informação sobre este tema em um único volume.

O livro está dividido em 18 capítulos sendo cada um deles desenvolvido por um pesquisador diferente. Em linhas gerais os principais temas tratados nos diferentes capítulos são: 'Histórico sobre a pesquisa da ativação dos macrófagos, Propriedades bioquímicas dos macrófagos ativados, Fagocitose e ativação dos macrófagos, Ativação dos macrófagos e resistência a infecções intracelulares, Macrófagos ativados e *Schistosoma mansoni*', 'Papel das linfoquinas na formação do granuloma'. Os últimos sete capítulos são dedicados ao papel tumoricida do macrófago ativado, mostrando claramente o interesse que este tipo de pesquisa tem em relação ao controle, tratamento e biologia do câncer no ser humano.

Cada capítulo possui uma ampla e adequada bibliografia; nela porém, não se faz menção ao título do trabalho citado, mas somente aos seus autores e fonte, o que faz com que os interessados em determinados trabalhos não saibam se este se refere a experiências em animais ou no homem, ou então sejam forçados a revisar um grande número de artigos para achar aquilo que procuram e que a menção do título teria dado em poucos segundos.

Em geral as pesquisas citadas no livro se referem a experiências feitas em animais de laboratório. Teria sido interessante incluir um capítulo sobre o que se conhece acerca da ativação macrofágica no ser humano. Isto foi feito somente no capítulo sobre schistosomose onde uma símula dos conhecimentos sobre os macrófagos são apresentados, com relação a esse tema específico.

Este livro é leitura obrigatória para todos aqueles interessados no campo da inflamação, fagocitose e ação tumoricida dos macrófagos.

Pedro Enrique Dorlhiac Llacer
Deptº de Hematologia
Faculdade de Medicina USP
Av. Dr. Arnaldo, 715
01255 São Paulo SP

Rigby, P.W.J. & Wilkie, N.M., eds. - *Viruses and cancer*. Cambridge, Cambridge University Press, Thirty-Seventh Symposium of the Society for General Microbiology, Apr. 1985, 323p., 1985. US\$ 64.50.

Como os editores escrevem prefácio desta obra, apesar dos constantes progressos havidos no campo das possíveis relações etiológicas entre vírus e câncer, continua precária uma ampla gama de informações sobre o papel de determinados genes na oncogênese, através da ação das proteínas codificadas pelos mesmos.

Os catorze capítulos desta obra contêm as mais recentes informações sobre a epidemiologia, biologia e virologia molecular de vários vírus cuja participação na oncogênese parece poder ser aceita, graças à colaboração de pesquisadores dos EUA, Bélgica, Inglaterra, Alemanha e Japão. São discutidos diferentes aspectos da atividade do vírus da hepatite B, papilomavírus, vírus de Epstein-Barr, adenovírus e retrovírus linfotrópicos e leucemógenos. O último capítulo dedica-se a fazer uma revisão sobre oncogene "ras", sua caracterização molecular e sua participação na transformação maligna de tumores humanos e de outros animais.

Todos os capítulos terminam com uma extensa e atualizada série de referências bibliográficas de grande utilidade para pesquisadores já engajados em atividades de pesquisa na área e necessitados de uma obra de referência de fácil consulta.

A recente identificação dos retrovírus HTLV confere aos quatro capítulos dedicados ao tema um particular interesse, merecendo salientar o capítulo dedicado à leucemia bovina, onde os dados discutidos mostram a muito provável relação de parentesco entre os vírus BLV e HTLV, o que tem implicações epidemiológicas, ao mesmo tempo que permite conhecer melhor os mecanismos de ação dos HTLV no homem. Uma característica importante da infecção pelo BLV é a habitual repressão transcripcional do genoma viral, isto é, as células linfáticas injetadas não têm a capacidade de sintetizar partículas virais, nem RNA mensageiro, donde resulta que o quadro clínico não é acompanhado de viremia. Vez por outra ocorre a derepressão do

provírus e esta expressão limitada e esporádica é suficiente para induzir a resposta humoral. Ora do mesmo modo que o BLV e ao contrário dos outros vírus leucenógenos, o HTLV-1, agente etiológico de certas leucemias humanas, está habitualmente reprimido, não ocorrendo viremia, mas podendo detectar-se a presença contínua de anticorpos virais. Estudos recentes mostram que a expressão do HTLV-1 está reprimida por um fator plasmático que não é um antícorpo, nem interferon, semelhante ao que reprime o BLV. Todos estes dados conferem ao BLV as características de um modelo de estudo de excepcional valor para identificar os fatores moduladores do genoma dos retrovírus leucenógenos, em geral e dos HTLV-I, HTLV-II e talvez do próprio HTLV-III, este último etiologicamente relacionado à síndrome de imunodeficiência adquirida. Em conclusão, constitue o presente livro obra do maior interesse para virologistas e para o próprio clínico.

José Alberto N. Candeias
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

XIV International Botanical Congress West Berlin, F.R.G. 24 July-August 1, 1987.
(The Expanding Realm of Yeast Like Fungi, 3-7 August, 1987).

Neste Simpósio de real interesse para os micologistas serão abordados vários temas sobre Taxonomia das diferentes ordens deste grupo de fungos, métodos taxonómicos atuais, tais como sistema coenzima Q, mananas extracellulares, sorologia, isoenzimas a nível de espécies, fusão de protoplastos e reassociação de DNA, assim como Ecologia de várias espécies.

Contribuições sobre os tópicos abordados serão aceitas e deverão ser apresentadas sob a forma de "Poster", cujos resumos deverão ser enviados até 01.04.87.

Maiores informações serão obtidas no seguinte endereço:

Dr.G.S. de Hoog e Dr. A.C.M. Weijman
Centralbureau voor Schimmelcultures - P.O. Box 273,
3740 AG Baarn - The Netherlands
Telefone: 31-2154-11841

Claudete R.P. Gandra
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

REVISTA DE MICROBIOLOGIA PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

VOLUME 17 JANEIRO-MARÇO 1986 NÚMERO 1

CONTEÚDO	CONTENTS	
Peres, C.S.; Figueiredo, M. da G.; Vitoratto, E.; & Perego Jr., L.	1 Crescimento de bactéria fotossintetizante (BF) anaeróbia em meio constituído de vinhaça	Growth of anaerobic photosynthetic bacteria in vinasse medium
Sant'Anna, E.S.; Teixeira, E.; & Moretto, E.	10 Crescimento de <i>Morchella</i> <i>crassipes</i> (Vent) Pers. em meio sintético e vinhaça	<i>Morchella crassipes</i> growth in synthetic and vinasse media

Ferraz, C.A.M.; Balloni, W.; & Florenzano, G.	15 Utilização de sub-produtos da indústria alcooleira na obtenção de biomassa de <i>Spirulina maxima</i> . Parte II - Emprego do resíduo da destilação do mosto fermentado (vinhaça)	Utilization of by-products from alcoholic fermentation industry to biomass production of <i>Spirulina maxima</i> . Part II - Use of molasses alcohol distillate waste
Almeida, P.F. de; Oliveira, J.V. de; & Hayashi, C.M.	22 Tipificação de <i>Rhodococcus</i> (<i>Corynebacterium</i> , <i>equi</i>) de origem bovina, ovina e caprina	Typification of <i>Rhodococcus</i> (<i>Corynebacterium</i>) <i>equi</i> from bovine, ovine and caprine sources
Yasuda, P.H.; Sulzer, C.R.; Giorgi, W.; & Soares, M.E.G.	25 <i>Leptospira biflexa</i> sorotipo <i>ranarum</i> isolado de feto abortado de equino	<i>Leptospira biflexa</i> serovar <i>ranarum</i> isolated from aborted equine foetus
Calixto, S.; Baldassi, L.; Moulin, A.A.P.; & Hipólito, M.	28 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como agente causal de abcesso em serpente (<i>Bothrops neuwiedi</i>)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> as a causal agent of snake abscess
Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Colli, I.A.G.; & Brito, J.R.F.	31 Detecção de antitoxina contra a enterotoxina termo-lábil (LT) de <i>Escherichia coli</i> em soro de suínos, através de reações de imuno hemólise	Detection of antitoxin against thermostable (LT) enterotoxin of <i>Escherichia coli</i> in porcine sera, by immune haemolysis reactions
Sargoni, A.E.; Franco, M.A.; & Torres, R.A. de	39 Viabilidad y multiplicación de <i>Listeria monocytogenes</i> cepa Murray frente a antimicrobianos de uso en medios selectivos	Effects of antimicrobial agents of potential utilization in selective media on viability and growth rate of <i>Listeria monocytogenes</i>
Hofling, J.F.	47 Mecanismos de infecções mistas por microrganismos anaeróbios da cavidade oral	Mechisms in polymicrobial oral infections
Andrade, J.R.C.; & Rosa, M.R. de S.	53 Aderência e penetração intracelular de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica em células <i>Hep-2</i>	Attachment and intracellular penetration of classic enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> into <i>Hep-2</i> cells
Asensi, M.D.; & Hofer, E.	58 Pesquisa de <i>Yersinia</i> enterocolítica em pacientes reumáticos. II - Sorologia	Investigation of <i>Yersinia enterocolitica</i> in rheumatic human patients. II - Serology

Mendonça, C.P.; Sole-Vernin, C.; & Nogueira, M.Z.;	64 Estreptococos beta-hemolíticos e níveis séricos de antiestreptolisina "O" em comunidade rural, Américo Brasiliense SP, 1981	Beta hemolytic streptococci and serum levels of ASO in a rural community, Américo Brasiliense SP, 1981
Informação Técnico-Científica SBM	71	
Anrain, E.	95 Biogás: Pesquisa ou aplicação - perspectivas	

VOLUME 17 ABRIL-JUNHO 1986 NÚMERO 2

	CONTÉUDO	CONTENTS
Monteiro, R.T.R.; & Hunter, M.I.S.	99 Composição lipídica de <i>Aspergillus nidulans</i>	Lipid class composition of <i>Aspergillus nidulans</i>
Bermudez, L.E.; Silva, V.M.M.; & Vidal, E.	102 Efeito do cloranfenicol sobre a função in vitro dos leucócitos polimorfonucleares (PMN)	Effect of chloramphenicol on the phagocytic function of polymorphonuclear leukocytes
Costa, E.O. da; Coutinho, S.D.; Castilho, W.; Teixeira, C.M.; Gambale, W.; Gandra, C.R. de P.; & Pires, M. de F.C.	107 Etiologia bacteriana da mastite bovina no Estado de São Paulo, Brasil	Bacterial aetiology of bovine mastitis, São Paulo State, Brazil.
Cauduro, P.F.; Mezzari, A.; Dias, C.A.G.; & Hofer, E.	113 Isolamento de <i>Salmonella</i> tennessee em fezes humanas no Rio Grande do Sul	<i>Salmonella tennessee</i> from human feces in Rio Grande do Sul, Brazil
Andrade, J.R.C.; & Rosa, M.R. de S.	116 Investigações sobre propriedade adesiva (aderência localizada) característica dos sorogrupos enteropatogênicos de <i>Escherichia coli</i>	Investigation on an adhesive property (localized adherence) characteristic of classic enteropathogenic serogroups of <i>Escherichia coli</i>
Cullen, B.T.; Falcão, D.P.; & Landgraf, M.	126 Análise microbiológica de alimentos infantis	Microbiological examination of infant foods
Lima, E. de O.; Maia, R.F.; Barbosa FQ, J.M.; & Xavier FQ, L.	132 Atividades antibacteriana e antifúngica de derivados mesoionicos	Antibacterial and antifungal activities of the mesoionic derivatives
Cury, A.E.	137 Atividade "in vitro" de alguns anti-sépticos sobre <i>Candida</i>	"In vitro" activities of some antiseptic drugs for <i>Candida</i>