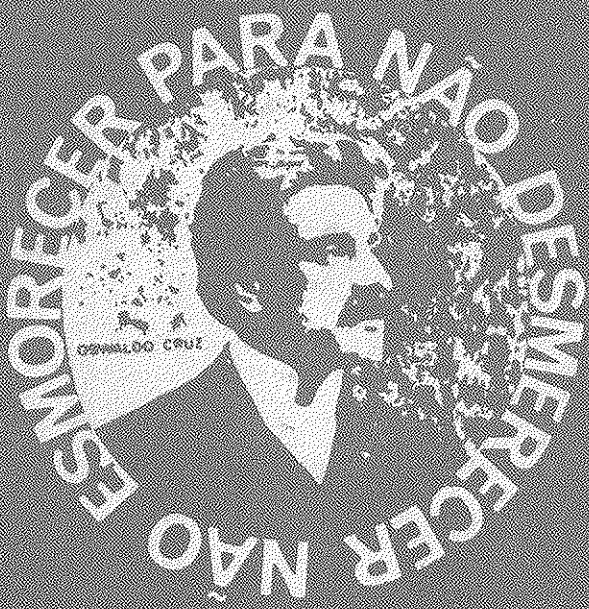


Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 18 Número 2 Abr.-Jun. 1987

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), 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 ($\mu l/litros/litro$). A Revista 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, a primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normografo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas devem ser feitas em papel 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. Os(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, os(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, Wilson Chagas de Araujo e João Salvador Furtado

Diretor Executivo Flávio Alterthum
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo SP

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números 5 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
Milton de Uzeda
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I — Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

Vice-Presidente
Flávio Alterthum
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP

Secretário Geral
Leonardo Perego Jr.
Faculdade de Ciências
Farmacêuticas USP
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP

Tesoureiro
Walderéz Gambale
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
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 agremiar 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:

Atlas Indústrias Químicas S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 18 ABRIL-JUNHO 1987 NÚMERO 2
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 18(2)

	CONTEÚDO	CONTENTS	
Uzeda, M. de; Ferreira, M.C. de S.; Filippis, I. de; & Bellintani, E.M.	117	Concentrações inibitórias mínimas de ciprofloxacin (BAY-9867) para bactérias isoladas no Rio de Janeiro, RJ	Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin (BAY-9867) for bacteria isolated in Rio de Janeiro
Velazco, C.; Filippis, I. de; Uzeda, M. de; & Benchetrit, L.C.	122	Sensibilidade de estafilococos coagulase negativos a ciprofloxacin in vitro	Susceptibility of coagulase negative staphylococci to ciprofloxacin in vitro
Almeida, A.M.P. de; Leal, N.C.; Brasil, D.P.; & Almeida, C.R. de	126	Estudo comparativo entre as técnicas de hemagglutinação e aglutinação bacteriana no diagnóstico da peste humana	Comparison of passive hemagglutination and bacterial agglutination tests for serodiagnosis of plague
Tamayo, R.; Schoebitz, R.; & Boldt, F.	131	Evidencia serológica de lengua azul (Bluetongue) en ovinos de la Décima Región de Chile	Serologic evidence of bluetongue virus in sheep of the Tenth Region, Chile
Freitas, A.C. de; Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D.	136	Comparação entre as técnicas de filtração e centrifugação no isolamento de <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> a partir de água	Comparison filtration and centrifugation techniques for isolation of <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> from water
Furlanetto, S.M.P.; Nader Fº, A.; Wilson, D.; & Schocken-Iturrino, R.P.	138	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigenicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas	Enterotoxigenic <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from milk of mastitic cows
Noletto, A.L.S.; & Tibana, A.	144	Surto de intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocólica B	Outbreak staphylococcal enterotoxin B food poisoning
Colen, G.; Nicoli, J.R.; & Vieira, E.C.	146	Seleção de microrganismos coagulantes do leite	Screening milk-clotting microorganisms
Baralle, S.B.; & Borzani, W.	151	Utilização preferencial da glicose na fermentação descontínua de soro de leite por <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Preferential utilization of glucose during batch fermentation of whey by <i>Lactobacillus bulgaricus</i>

Ferreira, S.V.; Silva, I.M. da; & Martelli, H.L.	156	Quantificação da coenzima F ₄₂₀ em lodo anaeróbio proveniente da biodigestão de vinhoto de cana	Quantification of the coenzyme F ₄₂₀ in anaerobic sludges from sugar cane stillage biodegradation
Linardi, V.R.; & Park, Y.K.	159	Melhoramento de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> por DNA transformante e fusão de protoplastos, para produção de amilase e proteases	Improvement of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> by DNA mediated transformation and protoplast fusion for amylase and proteases production
Eira, A.F. da; Minhoni, M.T. de A.; Salles F?, S.L.M.	166	Aparelho simplificado para determinação de carbono por combustão seca	Simplified apparatus to quantitative organic carbon determinations by dry combustion
Santos, M.A.A. dos; & Mós, E. do N.	169	Modificação da técnica "roll-tube" com meios de cultura pré-reduzidos para isolamento de microrganismos anaeróbios estritos	
Campos, E.P. de; Brasil, O.G.; & Campos, C.E.O.P. de	171	Redução da absorção de oxigénio por <i>Klebsiella</i> spp. sob ação de antimicrobianos	Oxygen uptake in Clark's polarography of <i>Klebsiella</i> spp. isolated from pulmonary infections
Jungmann, D.M.; & Ferreira, L.C. de S.	178	Cura de plasmídeos de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> pelo tratamento com sódio dodecil sulfato e incubação em temperatura elevada	Plasmid curing of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella typhimurium</i> by treatment with sodium dodecyl sulfate and high temperature incubation
Prieto, G.; Vargas, J.; & Martínez, A.	184	Caracterización genética y molecular de plásmidos que median multirresistencia en <i>Shigella</i>	Genetic and molecular characterization of plasmids that mediate multiresistance in <i>Shigella</i>
Informação Técnico-Científica SBM	193		

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS DE CIPROFLOXACIN (BAY-9867) PARA BACTÉRIAS ISOLADAS NO RIO DE JANEIRO, RJ*

Milton de Uzeda

Maria Candida de Souza Ferreira

Ivano de Filippis

Deptº de Microbiologia Médica

Instituto de Microbiologia da UFRJ

Centro de Ciências da Saúde

Bloco I - Ilha do Fundão

Caixa Postal 68040

21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

& Elizabeth Maria Bellintani (estagiária)

Laboratório de Bacteriologia

Hospital Universitário da UFRJ

Centro de Ciências da Saúde

Bloco I - Ilha do Fundão

Resumo

Foi determinada a concentração inibitória mínima in vitro do ciprofloxacin para cepas de enterobactérias, enterecocos, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* e bactérias anaeróbias estritas isoladas de diversos processos infeciosos de pacientes do Rio de Janeiro, RJ. A maioria das cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foi inibida com 0,25 μ g/ml do antimicrobiano, enquanto 1,0 μ g/ml foi necessário para inibir 90% das cepas de *Proteus* e *Staphylococcus*. A MIC₉₀ para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus faecalis* atingiu 2,0 μ g/ml; no entanto, para bactérias anaeróbias estritas (*Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens*) elevou-se para 16 e 8 μ g/ml, respectivamente. A análise da curva de morte empregando amostra-padrão de *Escherichia coli* (ATCC-25922) revelou o efeito bactericida do ciprofloxacin.

Summary

Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin (BAY-9867) for bacteria isolated in Rio de Janeiro

The minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin was determined in vitro for several strains of Enterobacteriaceae, entero-cocci, *Staphylococcus*, *Pseudomonas* and strictly anaerobic bacteria isolated from human infectious diseases occurring in Rio de Janeiro, RJ. Most of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains was inhibited with 0.25 μ g/ml of the antimicrobial agent while 1.0 μ g/ml was necessary to inhibit growth of 90% of *Proteus* and *Staphylococcus* strains. The MIC₉₀ for *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus faecalis* reached 2.0 μ g/ml, although for Bact-

*Trabalho desenvolvido no Deptº de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia da UFRJ.

roides fragilis and *Clostridium perfringens* increased to 16 and 8 μ g/ml, respectively. Kill-curve analysis employing a reference strain of *Escherichia coli* (ATCC-15922) showed a bactericidal effect of ciprofloxacin.

Introdução

Ciprofloxacin é um novo derivado do ácido quinolinico-carboxílico que apresenta amplo espectro de atividade inibitória sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, aeróbias, anaeróbias facultativas e estritas (3, 5, 8), incluindo cepas que se apresentam resistentes aos aminoglicosídeos e outros agentes antimicrobianos amplamente empregados, como os antibióticos beta-lactâmicos.

Considerando a possibilidade de diferenças regionais quanto à sensibilidade de bactérias a esta nova droga, determinamos a concentração inibitória mínima (CIM) do ciprofloxacin para cepas isoladas recentemente de pacientes infectados na cidade do Rio de Janeiro.

Material e Métodos

Cepas de bactérias - Foram testadas enterobactérias, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e enterococos provenientes de urinoculturas realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário da UFRJ e bactérias anaeróbias estritas (*Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens*) isoladas de diversos quadros infeciosos humanos no Laboratório de Anaeróbios do Instituto de Microbiologia da UFRJ.

Agente antimicrobiano - Ciprofloxacin (BAY 9867) foi utilizado na forma de pó seco fornecido por Miles Pharmaceuticals Inc. (West Haven, CT, EUA).

Teste de sensibilidade - Foi efetuada a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O ciprofloxacin foi diluído em ágar Mueller-Hinton (10), resultando em concentração finais que variaram de 32 a 0,007 μ g/ml na razão 1:2.

Para as cepas de *Proteus* e *Clostridium* empregamos o método da diluição em caldo na microplaca (2) com as mesmas concentrações finais empregadas no método descrito anteriormente.

Paralelamente, foram utilizadas cepas padrão de *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC-29213) e *Streptococcus faecalis* (ATCC-29212) visando o controle dos testes. Os inóculos utilizados apresentaram concentração aproximada de 5×10^5 unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml).

Curva de morte - A cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC-25922) foi submetida à análise da curva de morte (6). O microrganismo foi cultivado em 100ml de caldo Mueller-Hinton até atingir uma concentração aproximada de 10^7 UFC/ml sendo, logo após, adicionado o ciprofloxacin (tempo zero) resultando uma concentração de quatro vezes a CIM, determinada anteriormente.

Em intervalos regulares de 1, 2, 4, 24 e 48 horas, após o tempo zero, alíquotas da cultura foram submetidas à contagem de viáveis para determinação de UFC/ml.

Efeito do inóculo - A CIM do ciprofloxacin para *Escherichia coli* (ATCC-25922), em várias concentrações de inóculo, foi determinada em caldo Mueller-Hinton pela técnica de microdiluição (9). Concentrações variadas de ciprofloxacin em caldo Mueller-Hinton foram distribuídas em microplacas (Falcon BD, Oxnard, Ca, EUA) sendo logo após, adicionadas suspensões com 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , e 10^3 UFC/ml do microrganismo. Após 24 horas de incubação realizou-se a leitura dos resultados com a determinação das menores concentrações do antimicrobiano capazes de inibir o crescimento de diferentes suspensões da bactéria.

Tabela 1 - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM*₅₀ e CIM**₉₀) do ciprofloxacin para cepas de bactérias método de diluição em ágar e diluição em microplaca.

Símbolos: *CIM₅₀ = Concentração mínima capaz de inibir 50% das cepas testadas; **CIM₉₀ = Concentração mínima capaz de inibir 90% das cepas testadas; *** = Foi empregado o método de diluição do agente antimicrobiano em microplaca ("micro-broth")

Microrganismo	Nº de cepas testadas	Concentrações inibitórias mínimas (µg/ml)			Faixa de variação
		CIM ₅₀	CIM ₉₀		
<i>Escherichia coli</i>	114	0,06	0,25	0,01	a 1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	50	0,125	0,25	0,01	a 1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	0,06	0,125	0,06	a 0,125
<i>Enterobacter agglomerans</i>	5	0,06	0,125	0,03	a 0,125
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3	0,06	0,125	0,06	a 0,125
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	0,03	0,06	0,03	a 0,25
<i>Serratia marcescens</i>	13	0,25	1	0,125	a 1
<i>Proteus mirabilis***</i>	26	0,01	1	0,007	a 2
<i>Proteus vulgaris***</i>	10	0,03	1	0,007	a 1
<i>Providenciales sp.</i>	1	1	1	1	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	42	0,5	2	0,06	a 8
<i>Staphylococcus aureus</i>	7	0,5	1	0,25	a 1
<i>Staphylococcus coag. neg.</i>	6	1	1	0,5	a 1
<i>Streptococcus faecalis</i>	23	1	2	0,5	a 2
<i>Bacteroides fragilis</i>	32	4	16	2	a 32
<i>Clostridium perfringens***</i>	5	0,5	8	0,125	a 8
Cepas-padrão					
<i>Escherichia coli</i> (ATCC-15922)	1	0,03	0,03	0,03	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-29213)	1	1	1	1	
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-29213)	1	0,5	0,5	0,5	
<i>Streptococcus faecalis</i> (ATCC-29212)	1	1	1	1	

Resultados

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM₅₀ e CIM₉₀), bem como a faixa de variação estão representados na Tabela 1. A maioria das cepas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* foi inibida pela concentração de 0,25µg/ml, enquanto 1,0µg/ml foi necessário para inibir 90% das cepas de *Proteus* e *Staphylococcus*. A CIM₉₀ para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus faecalis* atingiu 2,0µg/ml, no entanto para bactérias anaeróbias estritas (*Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens*) elevou-se para 16 e 8µg/ml, respectivamente.

A curva de morte obtida com a cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC-25922) revelou que após quatro horas de incubação, ocorre um decréscimo de 1 log na contagem de viáveis. Em 24 horas não foi possível detectar qualquer número de bactérias viáveis (Figura 1).

Quanto ao efeito do inóculo é possível observar na Tabela 2 um decréscimo acentuado na concentração inibitória mínima quando se utiliza inóculos de 10⁸ UFC/ml (CIM = 4,0µg/ml) e de 10⁷ UFC/ml (CIM = 1,0µg/ml).

Discussão

Estudos de farmacocinética de ciprofloxacin (4) revelaram que, após administração oral de uma única dose de 500mg do antimicrobiano em voluntários humanos, os níveis séricos atingem até 2,4µg/ml. Estes resultados serviram de base para que as cepas

Tabela 2 - Concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacin para *Escherichia coli* (ATCC-25922) em diferentes concentrações de inóculo

Unidades formadoras de colônias (UFC) /ml	Concentração inibitória mínima (CIM) de ciprofloxacin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
$1,0 \times 10^8$	4,0
$2,5 \times 10^7$	1,0
$6,25 \times 10^6$	0,015
$3,9 \times 10^5$	0,0018
$2,4 \times 10^4$	0,0009
$6,1 \times 10^3$	0,00045

que exigem CIM $\leq 1,0\mu\text{g}/\text{ml}$ sejam consideradas sensíveis e aquelas que exigem CIM $\geq 4,0\mu\text{g}/\text{ml}$ sejam consideradas resistentes (1).

Neste sentido, pudemos evidenciar que o ciprofloxacin apresentou um amplo espectro de atividade inibitória in vitro para a maioria das cepas testadas e que, de um modo geral, nossos resultados foram semelhantes aos de outros autores (1, 3, 5). Deve ser destacada também, a ocorrência de microrganismos resistentes ou pouco sensíveis ao antimicrobiano, principalmente a maioria das cepas de *Bacteroides fragilis* e algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*.

Outrossim, considerando-se que a concentração de ciprofloxacin na urina, após administração oral de 500mg, atinge sempre níveis acima de $2,0\mu\text{g}/\text{ml}$ (4) deve ser avaliada sua maior eficácia no tratamento de infecções urinárias bacterianas.

As curvas de morte têm a finalidade de verificar se o antimicrobiano tem atividade bactericida, característica importante em inúmeras ocasiões de seu emprego na prática médica (7). Da análise dos resultados é possível definir, preliminarmente, o ciprofloxacin como um antimicrobiano bactericida pois apresentou eficácia na destruição bacteriana, conforme foi revelado pela redução do número de microrganismos viáveis após 24 horas de incubação. Este efeito bactericida pode ser confirmado pela verificação de uma relação direta entre o número de bactérias (concentração bacteriana) e a CIM obtida com a droga testada. Cabe ressaltar que o número de células recomendadas para determinação da CIM pelo teste da diluição em caldo é de 10^5 UFC/ml e que a utilização de inóculo "2 x log 10" é suficiente para aumentar significativamente a CIM (Tabela 2).

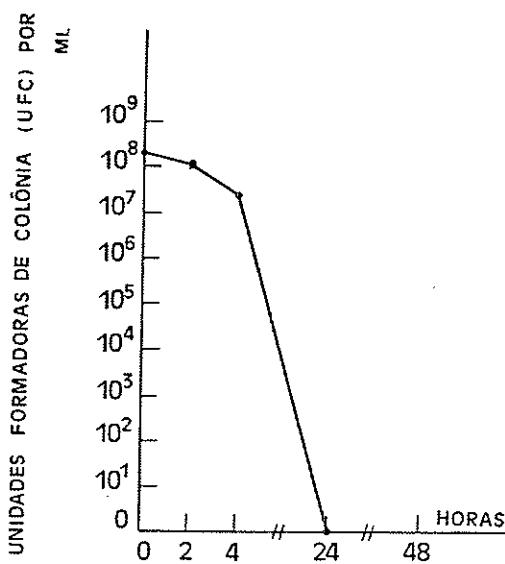
Agradecimentos

Agradecemos à Profª Ivone Rocco Suassuna, Chefe do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário da UFRJ, pelo fornecimento das cepas bacterianas empregadas neste estudo.

Referências Bibliográficas

- Barry, A.L.; Jones, R.N.; Thornsberry, C.; Ayres, L.W.; Gerlach, E.H. & Sommers, H.M. - Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 25:633-637, 1984.

Figura 1 - Curva de morte para *Escherichia coli* (ATCC 25922) com ciprofloxacin ($0,12\mu\text{g}/\text{ml}$)



2. Barza, M.; Tally, F.P.; Jacobus, N.V. & Gorbach, S.L. - In vitro activity of LY 127935. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 16:287-292, 1979.
3. Chin, N. & Neu, H.C. - Ciprofloxacin, a quinolone carboxilic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 25:319-326, 1983.
4. Crump, B.; Wise, B. & Dent, I. - Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 24:784-786, 1983.
5. Eliopoulos, G.M.; Gardella, A. & Moellering Jr., R.C. - In vitro activity of ciprofloxacin, a new carboxyquinoline antimicrobial agent. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 25:331-335, 1983.
6. Jacobus, N.V.; Ferreira, M.C. & Barza, M. - In vitro activity of aztreonam, a monobactam antibiotic. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 22:832-838, 1982.
7. Krogstad, D.J. & Moellering Jr., R.C. - Combinations of antibiotics, mechanisms of interaction against bacteria. In: - Lorian, V. - *Antibiotics in laboratory medicine*. New York, Williams & Wilkins, p.298-341, 1980.
8. Rudin, E.J.; Norden, C.W. & Shinners, E.M. - In vitro activity of ciprofloxacin against aerobic gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents & Chemother.*, 26:597-598, 1984.
9. Tally, F.P. & Gorbach, S.L. - Antimicrobial susceptibility testing. In: - *Anaerobic bacteriology for clinical laboratories*. Boston, Mass., Tufts University School of Medicine, p.45-57, 1980.
10. Washington II, J.A. & Sutter, V.L. - Dilution susceptibility test: agar macro-broth dilution procedures. In: - Lennette, E.H.; Balows, A; Hausler Jr., W.J. & Truant, J.P. - *Manual of clinical microbiology*. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p.453-458, 1980.

SUSCEPTIBILITY OF COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCI TO CIPROFLOXACIN IN VITRO

Corsina Velazco
Ivano de Filippis
Milton de Uzeda
& Leslie C. Benchetrit

Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
Caixa Postal 68040
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

Coagulase-negative staphylococci strains isolated from human infections were studied for susceptibility to ciprofloxacin. Of the 83 strains tested, 82 were sensitive to the antibiotic as determined by the disk (5 μ g) diffusion method and their growth was inhibited by a drug concentration of 1 μ g/ml.

Resumo

Sensibilidade de estafilococos coagulase negativos a ciprofloxacin in vitro

A sensibilidade ao ciprofloxacin foi testada in vitro em 83 cepas de estafilococos coagulase-negativas isoladas de infecções humanas. De 83 cepas, 82 mostraram-se sensíveis ao antibiótico pelo método de difusão com disco (5 μ g) e foram inibidas na concentração de 1 μ g/ml da droga.

Introduction

The search for new antibacterial drugs continues in order to develop agents with greater activity against a wider spectrum of pathogens than the drugs that are already available.

Ciprofloxacin is a new quinolone structurally related to nalidixic acid and norfloxacin and characterized by a marked activity and a broad antimicrobial spectrum in a variety of bacterial infections embracing those caused by important Gram-positive and Gram-negative microorganisms (1, 3, 4, 5, 10, 16).

Coagulase-negative staphylococci (CNS) have been implicated in various human infections particularly those affecting the urinary tract (6, 12, 14). The reasons for the emergence of these organisms as pathogens are not known. However the relatively high incidence of resistance to many of the commonly used antibiotics may have played a part.

The purpose of the present study, therefore is to describe the in vitro antimicrobial activity of ciprofloxacin against clinical isolates of these important human pathogens.

Materials and Methods

Strains - We studied 83 coagulase-negative staphylococci isolated from clinical

Rev. Microbiol., São Paulo, 18(2):122-125, Abr./Jun. 1987.

specimens (urine and blood, Table 1). They were identified by using the scheme of Kloos and Scheifer (7, 8, 11). The species of the strains listed under "unidentified" were not determined.

Antibiotic - A standard powder of ciprofloxacin (potency, 853 μ g/mg) was supplied by the manufacturer (Miles Pharmaceuticals Inc.). Paper disks contained 5 μ g of antibiotic (Oxoid).

Susceptibility tests - We have used the standard disk diffusion test to determine the susceptibility of the organisms to the antibiotic (9). Zone diameters obtained for individual strains within each species were measured and interpreted as follows: ≤ 12 mm, resistant; 13-17mm, intermediate; ≥ 18 mm, sensitive. Minimum inhibitory concentrations were determined by the serial dilution method with use of the multiple inoculator device of Steers (13) and standardized bacterial inocula (15). The dilution schemes ranged from 0.07 to 8 μ g/ml. Plates contained Mueller-Hinton medium and MICs were read after incubation at 37°C for 18 hours. The quality control microorganisms used were from the American Type Culture Collection: *E. coli* 25922, *P. aeruginosa* 27853, *S. faecalis* 29212, *S. aureus* 25293 and 29213.

Results

In the reference strains, the MICs and the diameters of the zones of inhibition around the disks were as follows: *E. coli*, 0.03 μ g/ml and 34mm; *P. aeruginosa*, 1 μ g/ml and 26mm; *S. faecalis*, 1 μ g/ml and 20mm; *S. aureus* 29213, 1 μ g/ml and 20mm; *S. aureus* 25293, 1 μ g/ml and 22mm.

The spectrum of ciprofloxacin antibacterial activity is summarized in Table 2. A concentration of 1 μ g/ml prevented the growth of 82 of 83 strains. Against *S. epidermidis* isolates, ciprofloxacin exhibited 50 and 90% inhibitions with MICs of 0.5 and 1.0 μ g/ml respectively. The antibiotic was equally active against strains of all other species with 1 μ g/ml required to inhibit either 50 or 90% of the organisms.

All but one of the staphylococcal strains were susceptible to the antibiotic when tests were performed according to the single disk method. The *S. saprophyticus* isolate that was classified as intermediate had the highest MIC of all the strains tested (2 μ g/ml; Table 2).

Table 1 - Speciation and origin of staphylococcal strains tested.

Symbols: * = CNS isolates were speciated using the scheme suggested by Kloos and Schleifer (7, 8, 11)

Species*	Sites		Total
	Urine	Blood	
<i>S. saprophyticus</i>	38	4	42
<i>S. epidermidis</i>	4	11	15
<i>S. cohnii</i>	9	1	10
<i>S. warneri</i>	5		5
<i>S. simulans</i>	1	1	2
<i>S. xylosus</i>	2		2
<i>S. haemolyticus</i>		1	1
Unidentified	1	5	6
Total	66	17	83

Discussion

The multiplicity of biochemical mechanisms for antibiotic-resistance in bacteria and the emergence and dissemination of resistant strains in hospital isolates justify research on new drugs.

Ninety per cent of coagulase-positive staphylococcal strains (5, 16) or CNS isolates (5) were shown to be inhibited by 0.5 μ g of ciprofloxacin per ml. In all cases, the MIC values ranged from 0.12 to 1.0 μ g/ml. In the present study, ciprofloxacin exhibited a good antimicrobial activity against the different species of CNS. Most of the strains tested were inhibited by the drug in a concentration of $\leq 1\mu$ g/ml and were considered as sensitive. Strains for which the MICs were 2.0 μ g/ml and 4 μ g/ml are considered to be intermediate and resistant respectively (1). These values are from studies on the pharmacokinetics of the drug (2). When a single dose

Table 2 - Susceptibility of coagulase-negative staphylococcal strains to ciprofloxacin

Species	Nr. of strains with indicated MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$)				Diameter of the zone of inhibition (mm \pm standard deviation)
	0.25	0.5	1.0	2.0	
<i>S. saprophyticus</i>		15	26	1	26.5 \pm 2.0
<i>S. epidermidis</i>	7	2	6		25.6 \pm 4.0
<i>S. cohnii</i>		1	9		24.3 \pm 1.5
<i>S. warneri</i>		1	4		23.4 \pm 2.4
<i>S. simulans</i>			2		25.0 \pm 1.4
<i>S. xylosus</i>			2		27.0 \pm 4.2
<i>S. haemolyticus</i>			1		29.0
Unidentified	1		5		26.3 \pm 6.5
Total	8	19	55	1	

of ciprofloxacin is given orally to humans, the peak serum level at 1.25 hour is 2.4mg/ml and the blister fluid maximum level exceeds 0.82 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Elimination half-life reaches 5.6 hours and 30% of the drug is recovered in the urine in a concentration of 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. This prompted the authors to suggest that the drug could be used in systemic and urinary tract infections. The MIC of ciprofloxacin determined in our study did not fall less than the concentration in serum reported by Crump & col. (2); therefore the results of the present study suggest that ciprofloxacin could be an effective antibiotic useful for therapy of infections caused by species of CNS.

Antibiotic-resistance in bacteria may vary markedly, especially if hospitals strains are studied. Extensive usage of an antimicrobial agent may also result in the emergence and spread of organisms resistant to the agent or to more drugs eventhough the percentage of natural or acquired resistance remains low. Thus, the introduction of new drugs related or even unrelated to antibiotics against which bacteria are already resistant can provide a temporary respite. The period of time during which the new drugs are useful can also be extended by proper selection of patients or infections in which the agent is used. This includes in vitro studies of their activity against microorganisms as report here.

Acknowledgments

This study was supported by CNPq, FINEP and CEPG/UFRJ. CV was a recipient of a fellowship from the American States Organization. We thank Miles Pharmaceuticals for the gift of ciprofloxacin.

References

1. Barry, A.L.; Jones, R.N.; Thornsberry, C.; Ayers, L.W.; Gerlach, E.H. & Sommers, H.M. - Antibacterial activities of ciprofloxacin, norfloxacin, oxolinic acid, cinoxacin and nalidixic acid. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25:633-637, 1984.
2. Crump, B.; Wise, R. & Dent, J. - Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24:784-786, 1983.
3. Chin, N. & Neu, H.C. - Ciprofloxacin, a quinolone carboxilic acid compound active against aerobic and anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25:319-326, 1983.
4. Eliopoulos, G.M.; Gardella, A. & Moellering Jr., R.C. - In vitro activity of ciprofloxacin, a new carboxyquinoline antimicrobial agent. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 25:331-335, 1983.
5. Fass, R.J. - In vitro activity of ciprofloxacin (Bay 9867). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24:568-574, 1983.

6. Hovelius, B. & Mårdh, P.A. - *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause of urinary tract infections. Rev. Infect. Dis., 6:328-337, 1984.
7. Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. - Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II - Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. Int. J. Syst. Bacteriol., 25:62-79, 1975.
8. Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. - Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. J. Clin. Microbiol., 1:82-88, 1975.
9. National Committee on Clinical Laboratory Standards - Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests-approved standard: ASM-2, revised National Committee on Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa., 1979.
10. Rudin, E.J.; Norden, C.W. & Shinner, E.M. - In vitro activity of ciprofloxacin against aerobic Gram-negative bacteria. Antimicrob. Agents & Chemother., 26:595-598, 1984.
11. Scheifer, K.H. & Kloos, W.E. - Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I - Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. Int. J. Syst. Bacteriol., 25:50-61, 1975.
12. Sewell, C.M.; Clarridge, J.E.; Young, E.J. & Guthrie, R.K. - Clinical significance of coagulase negative staphylococci. J. Clin. Microbiol., 16:236-239, 1982.
13. Steers, E.; Foltz, E.L. & Graves, B.S. - An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. Antibiot. Chemother. (Basel), 9:307-311, 1959.
14. Wallmark, G.; Arremark, I. & Télander, B. - *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. J. Infect. Dis., 138:791-796, 1978.
15. Washington, J.A. & Sutter V.L. - Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: - Lennette, E.H.; Balows, A; Hausler Jr., W.J. & Truant, J.P., eds. - Manual of clinical microbiology. 3.ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, p.453-458, 1980.
16. Wise, R.; Andrews, J.M. & Edwards, L.J. - In vitro activity of Bay 09867 a new quinoline derivative, compared with those of other antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother., 23:559-564, 1983.

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE AS TÉCNICAS DE HEMAGLUTINAÇÃO E AGLUTINAÇÃO BACTERIANA NO DIAGNÓSTICO DA PESTE HUMANA

Alzira Maria Paiva de Almeida
 Nilma Cintra Leal
 Darcy Pascoal Brasil
 & Célio Rodrigues de Almeida (Bolsista do CNPq)
 Laboratório de Peste
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (Fiocruz)
 Caixa Postal 7472
 50000 Recife PE, Brasil

Resumo

A técnica de aglutinação bacteriana com 12 cepas de *Yersinia pestis*, foi utilizada para reexaminar 194 soros humanos negativos ao teste de hemaglutinação passiva (PHA) contra a fração antigenica purificada 1A da *Y. pestis*, empregado rotineiramente no diagnóstico da peste humana. Os soros foram obtidos de pacientes considerados suspeitos de peste por evidência clínica e epidemiológica. Nenhum dos soros negativos ao teste de hemaglutinação apresentou anticorpos aglutinantes contra as cepas bacterianas testadas, enquanto que entre os soros controles positivos, obteve-se maior frequência de aglutinação naqueles com títulos hemaglutinantes mais elevados. Sendo menos sensível, a técnica de aglutinação bacteriana não ofereceu vantagem sobre a hemaglutinação.

Summary

Comparison of passive hemagglutination and bacterial agglutination tests for serodiagnosis of plague

The bacterial agglutination test, with 12 strains of *Yersinia pestis*, was employed in the reexamination of 194 human sera, that had previously proved to be negative to passive hemagglutination test (PHA). The PHA test for antibodies against *Y. pestis* purified fraction 1A antigen, is the most widely used serological test for plague in the world today. Sera were obtained from patients suspected of having plague by epidemiological and clinical evidence. In our study, none of the PHA negative sera, had agglutinating antibodies against the bacterial strains tested. Agglutination occurring more likely with high titered PHA control sera. Bacterial agglutination test was useless to detect plague antibodies in human sera in the failure of the PHA test.

Introdução

A infecção pela *Yersinia pestis* se mantém nos focos naturais distribuídos mundialmente. No Brasil os focos da infecção estão concentrados na zona semi-árida da região Nordeste e na Serra dos Órgãos (Estado do Rio de Janeiro). Atividade recente desses focos foi demonstrada pelo isolamento da *Y. pestis* de roedores e pulgas ou detecção de anticorpos antipestosos em roedores e carnívoros domésticos e selvagens (1, 2, 3, 4, 5, 10). No período de 1980 a 1985 foram registrados pela

SUCAM/MS, 497 casos humanos de peste nos Estados de Pernambuco, Ceará, Bahia e Minas Gerais, com base em evidência clínica, epidemiológica e laboratorial.

A microtécnica da hemaglutinação passiva (PHA) para anticorpos contra a fração purificada, F1A da *Yersinia pestis* é empregada no diagnóstico da peste humana e na vigilância da peste em roedores e outros mamíferos, principalmente carnívoros domésticos e selvagens, em todos os focos do mundo.

Desde 1978, a PHA vem sendo utilizada no diagnóstico da peste em pacientes de focos pestosos do Brasil; entretanto tem sido observado elevado número de resultados negativos (1, 10). Foi admitido que outras entidades nosológicas podem estar confundindo o diagnóstico clínico da peste nesses focos ou que estes resultados negativos sejam decorrentes da falta de resposta ao antígeno purificado (F1A) da *Y. pestis* empregado na PHA ou da colheita das amostras em período inadequado (1).

A fim de verificar estas duas últimas hipóteses, realizamos estudo em soros negativos ao PHA utilizando teste de aglutinação bacteriana (6, 8) com cepas de *Y. pestis* originadas de focos brasileiros, visando detectar anticorpos contra抗ígenos das cepas nacionais.

Material e Métodos

Microtécnica da hemaglutinação passiva (PHA) - Técnica de "Plague Branch, Centers for Disease Control, Fort Collins, Colorado, USA", recomendada pelo Comitê de Peritos em Peste (13) com antígeno (F1A) da *Y. pestis* obtido pelo método do "Plague Branch" baseado em Baker & col. (7).

Aglutinação bacteriana - Foram usados como抗ígenos (cepa total) suspensões das seguintes cepas de *Y. pestis* preparadas segundo Bahmanyar & Cavanaugh (6):

- 1 - GRS 01 - roedor - Rubelita/MG, 1983.
- 2 - BA 02 - pulga de roedor - Feira de Santana/BA, 1984.
- 3 - BA 03 - humana - Poções/BA, 1984.
- 4 - P.EXU 509 - humana - Guaraciaba do Norte/CE, 1971.
- 5 - P.EXU 540 - humana Ipueiras/CE, 1971.
- 6 - P.EXU 743 - roedor - Araripe/PE, 1975.
- 7 - P.EXU 835 - roedor - Ipu/CE, 1979.
- 8 - P.EXU 792 - humana - Ipu/CE, 1978.
- 9 - P.EXU 803 - humana - São Benedito/CE, 1978.
- 10 - P.EXU 807 - humana - Ipu/CE, 1979.
- 11 - P.EXU 826 - pulga de roedor - São Caetano/PE, 1979.
- 12 - All22 - (cepa padrão fornecida pelo "Plague Branch").

As suspensões bacterianas estoque foram diluídas em FTA hemagglutination buffer (pH 7.2) formalizado (0,4%), a 0,2 de absorbância a 485nm em espectrofotômetro de Coleman, com o acréscimo de 0,1ml de solução aquosa (0,5%) de safranina, por 10ml de suspensão de抗ígeno.

Os testes foram realizados pelo método de Widal modificado, em placas de microtitulação com soros não inativados e não diluídos, ou diluídos de 1/2 a 1/16 com microtituladores de 0,025ml em 0,025ml de FTA hemagglutination buffer, pH 7.2 + 0,4% de formalina + 1/100 de soro normal de coelho, inativado a 60°C durante 20', acrescentando-se 0,025ml das suspensões antigenicas. As placas foram agitadas suavemente, incubadas em câmara úmida a 37°C durante 2hs e até o dia seguinte em geladeira. As leituras foram realizadas a olho nu, depois de 30' à temperatura ambiente, considerando como título a maior diluição do soro com nitida aglutinação.

Soros testes - 194 amostras de soros colhidos durante as investigações realizadas pela SUCAM/MS em 150 pacientes considerados suspeitos de peste pela presença de febre e linfadenite e submetidos ao PHA no Laboratório de Peste do CPqAM, durante o ano de 1985, com resultados negativos. Foram obtidas amostras pareadas de 44 pacientes: a primeira colhida entre o 1º e o 229 dia após o aparecimento dos primeiros sintomas e a segunda entre 14 e 94 dias do início da doença.

Dos outros 106 pacientes, 28 amostras foram colhidas no período de 1 a 5 dias do

início da doença, 22 entre 6 e 10 dias, 11 entre 11 e 15 dias e 45 de 16 a 60 dias. A casuística foi composta de 43 pacientes do sexo feminino e 107 do sexo masculino, procedentes dos Estados de Pernambuco (2), Rio de Janeiro (3), Paraíba (5), Bahia (29) e Ceará (111).

Soros controles - 34 soros de pacientes com títulos hemaglutinantes de 1/4 a $\geq 1/8192$, obtidos de pacientes dos Estados de Pernambuco, Paraíba, Bahia e Ceará no período de 1980 a 1985.

7 soros de pacientes de área não endêmica de peste, com títulos significativos para brucelose, toxoplasmose, mononucleose e as reações de Widal e VDRL, fornecidos pelo Setor de Imunologia da FUSAM/Recife/PE.

1 soro humano normal (Normal Clinical Chemistry Control Serum, Metrix).

1 soro normal de coelho (Laborclin).

Antissoros - Preparados por inoculação convencional em 2 coelhos da cepa A1122 morta pelo formol, e 2 coelhos com F1A em adjuvante incompleto de Freund, seguindo protocolo do "Plague Branch".

Resultados

Os 194 soros dos pacientes suspeitos de peste que não revelaram anticorpos hemaglutinantes contra a F1A, também não apresentaram aglutininas contra nenhuma das 12 cepas de *Yersinia pestis* estudadas.

Dos 34 soros com títulos hemaglutinantes entre 1/4 a $\geq 1/8192$, 16 aglutinaram todos os抗ígenos testados, em títulos de 1/2 a $\geq 1/32$. A Tabela 1 mostra a distribuição dos soros examinados que apresentaram aglutininas contra os抗ígenos testados em relação aos respectivos títulos de hemaglutinação.

Foi observada frequência máxima de aglutinação (100%) das cepas de *Y. pestis* pelos soros com títulos de anticorpos hemaglutinantes contra a F1A $\geq 1/1024$. Na faixa de títulos de 1/64 a 1/512 obteve-se 41% de aglutinação. Excepcionalmente, 1 soro da faixa de títulos hemaglutinantes $< 1/32$, aglutinou todos os抗ígenos testados. Este soro tinha um título de 1/4 de anticorpos hemaglutinantes contra a F1A.

Os soros normais de coelho e humano e os soros dos pacientes de zona não endêmica de peste, com títulos significativos para brucelose, toxoplasmose, mononucleose e as reações de Widal e VDRL, não apresentaram anticorpos hemaglutinantes contra a F1A, nem aglutininas para nenhuma das cepas de *Yersinia pestis*.

Os antissoros de coelho (2 anti-A1122 e 2 anti-F1A) cujos títulos hemaglutinantes eram $\geq 1/512$, aglutinaram todas as cepas de *Y. pestis* usadas como抗ígeno nos testes realizados, em títulos de 1/4 a $\geq 1/32$.

Discussão

A pesquisa de anticorpos hemaglutinantes contra a fração antigênica purificada, F1A da *Y. pestis* tem resultado negativo em numerosos pacientes com diagnóstico clínico de peste nos focos pestosos do Brasil (1, 10).

Tabela 1 - Distribuição dos soros por faixa de título hemaglutinante contra a F1A, que apresentaram aglutininas para as 12 cepas de *Yersinia pestis* testadas

Títulos hemaglutinantes	1/4 a 1/32	1/64 a 1/512	1/1024 a 1/8192
Número de soros testados	12	12	10
Número de soros com aglutininas	1	5	10
% de soros com aglutininas	8,3	41,7	100

Marshall & col. (11) também não conseguiram detectar anticorpos no soro de pacientes do Vietnam com infecção comprovada pelo isolamento do bacilo, nem elevação significativa do título de anticorpos em amostras pareadas obtidas de pacientes na fase aguda e no período de convalescência. Segundo esses autores os soros foram obtidos demasiado cedo e o intervalo entre as colheitas muito curto, no caso das amostras pareadas. Por outro lado, Butler & Hudson (9) mostraram que anticorpos hemaglutinantes contra a F1A podem ser detectados desde o 5º dia da doença e aumentam progressivamente até o 14º dia, ocorrendo um "plateau" que persiste por vários meses. O título hemaglutinante de 1/16 que é considerado o mínimo significativo para o diagnóstico da peste é atingido em torno do 8º dia da doença. Das 194 amostras de soro analisadas no presente estudo, 80% foram obtidas após o 4º dia do início da doença e no caso das amostras pareadas, o intervalo médio entre as colheitas foi de 4 semanas. Como as amostras de soro dos pacientes foram obtidas no período em que se espera detectar uma resposta sorológica, a hipótese da colheita em tempo inadequado não justifica a falta de resposta desses pacientes.

Recentemente Poland & Barnes (12) referiram a possibilidade da falta de resposta ao antígeno purificado F1A da *Y. pestis*, empregado no teste de hemaglutinação, no caso de infecções decorrentes de cepas atípicas que ocorrem na natureza incapazes de produzir este antígeno. Estes autores sugerem que no caso de falta de resposta ao PHA, seja tentado o teste de aglutinação bacteriana (6, 8) para detectar anticorpos para outros抗ígenos da *Y. pestis*. Aglutininas contra a *Y. pestis* podem ser encontradas desde o 4º dia de doença e o título aumenta significativamente no período de convalescência (12). Neste estudo utilizamos nos testes de aglutinação 11 cepas nacionais oriundas de diferentes fontes, além de uma cepa padrão de laboratório, procurando detectar resposta sorológica aos抗ígenos presentes nessas cepas. Os 194 soros de pacientes suspeitos de peste que não apresentavam anticorpos hemaglutinantes contra a F1A, assim como os soros controle de pacientes de área não endêmica com títulos significativos para brucelose, toxoplasmose, mononucleose, e as reações de Widal e VDRL, também não revelaram aglutininas contra nenhuma das cepas bacterianas testadas. Em contrapartida, os antissoros de coelho (anti-A1122 e anti-F1A) e os soros humanos com altos títulos hemaglutinantes (Tabela 1) apresentaram aglutininas, porém em títulos inferiores aos de PHA. Cada soro aglutinou todas as cepas testadas, independente da origem geográfica ou da fonte da qual foi originada. Por este estudo concluímos que os soros negativos ao PHA também não apresentam aglutininas contra a *Y. pestis* (cepa total) sendo obtida maior frequência de aglutinação nos soros com títulos hemaglutinantes mais elevados. Portanto, a técnica de aglutinação é menos sensível e não oferece nenhuma vantagem sobre o PHA no diagnóstico da peste.

Outros estudos devem ser realizados a fim de esclarecer o problema constituído por este grupo de pacientes com diagnóstico clínico de peste, porém, negativos ao teste de hemaglutinação.

Referências Bibliográficas

1. Almeida, C.R.; Almeida, A.M.P.; Vieira, J.B.; Guida, U. & Butler, T. - Plague in Brazil during two years of bacteriological and serological surveillance. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 59:591-597, 1981.
2. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Silva, N.T.C. & Almeida, C.R. - Informe sobre a peste bubônica (infecção por *Yersinia pestis*) no Estado de Minas Gerais, Brasil. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 15:145-146, 1984.
3. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Carvalho, F.G. & Almeida, C.R. - Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 27:207-218, 1985.
4. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B.; Leal, N.C. & Almeida, C.R. - Detecção da peste no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), 16:232-233, 1985.

5. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B.; Nakazawa, M. & Almeida, C.R. - Demonstração de atividade pestosa no foco da Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brasil) no período de 1983 a 1984, através de exames sorológicos em roedores. Rev. Microbiol. (São Paulo), 16:280-281, 1985.
6. Bahmanyar, M. & Cavanaugh, D.C. - Plague manual. Geneva, World Health Organization, 1976.
7. Baker, E.; Sommer, H.; Foster, L.E.; Meyer, E. & Meyer, K.F. - Studies on the immunization against plague. I - The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol., 68:131-145, 1952.
8. Baltazard, M.; Davis, D.H.S.; Devignat, R.; Girard, G.; Gohar, M.A.; Kartman, L.; Meyer, K.F.; Parker, M.T.; Pollitzer, R.; Prince, F.M.; Quan, S.F. & Wagle, P. - Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague. Bull. Wld. Hlth. Org., 14:457-509, 1956.
9. Butler, T. & Hudson, B.W. - The serological response to *Yersinia pestis* infection. Bull. Wld. Hlth. Org., 55:39-42, 1977.
10. Butler, T.; Almeida, C.R.; Almeida, A.M.P.; Guida, U.; Vieira, J.B.; Franco, A. & Quan, T. - Estudos sorológicos e experimentais da peste no Nordeste do Brasil. Rev. Brasil. Malariol. D. Trop., 32:26-35, 1980.
11. Marshall, J.D.; Gibson, F.L.; Dung, T.C. & Quy, D.V. - Early serological non-response in human plague infections. Bull. Wld. Hlth. Org., 37:495-497, 1967.
12. Poland, J.D. & Barnes, A. - Plague. In: - Steele, J.H. - CRC handbook series in zoonoses. Section A - Bacterial, rickettsial and mycotic diseases. Boca Raton, CRC Press, v.1, p.515-597, 1979.
13. WHO Technical Report Series - WHO Expert Committee on Plague. Fourth Report, 447:23-25, 1970.

EVIDENCIA SEROLÓGICA DE LENGUA AZUL (BLUETONGUE) EN OVINOS DE LA DÉCIMA REGIÓN DE CHILE

Rafael Tamayo
 Renate Schoebitz
 & Freddy Boldt

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

Resumen

Una muestra de 1.427 sueros de ovinos provenientes de 78 rebaños de la Décima Región de Chile, fueron recolectados entre agosto de 1983 y agosto de 1984 con el fin de determinar anticuerpos de lengua azul mediante la prueba de inmunodifusión. La prevalencia de anticuerpos de lengua azul fue de 6.5%. Treinta y un (39.7%) rebaños presentaron a lo menos un animal positivo. La distribución de anticuerpos según edad, sexo, época del año, tamaño y sistema de explotación es discutida. No existen casos clínicos de lengua azul confirmados en la zona muestreada y no se ha aislado el virus que indique el(o los) serotipo(s) que eventualmente cause(n) la enfermedad.

Summary

Serologic evidence of bluetongue virus in sheep of the Tenth Region, Chile

A sample of 1.427 ovine sera collected from 78 flock in the Tenth Region, Chile, from August 1983 to August 1984, was analysed for bluetongue (BT) antibodies using the immunodiffusion test. The prevalence of BT virus antibody was 6.5%. Thirty one (39.7%) flocks showed at least 1 positive animal. The distribution of antibody by age, sex, season of the year, size of the flock, and type of management are discussed. None report of clinical cases of the disease have been confirmed in the country.

Introducción

Lengua azul es una enfermedad viral, la cual afecta a una variedad de rumiantes, siendo los ovinos la especie doméstica más afectada (4, 13). A pesar de ser una entidad que en algunas partes del mundo aparentemente no causa signos clínicos de enfermedad, las pérdidas económicas causadas por lesiones han sido demostradas por varios autores (4, 17, 18).

En América del Sur se ha sospechado de casos clínicos de la enfermedad en Perú y Chile (11). Recientemente se ha informado de evidencia serológica de la enfermedad, la cual se distribuye ampliamente en varias especies de rumiantes de América Central y del Sur (6, 8, 16). El aislamiento del virus ha sido confirmado solamente desde Brasil (7). El objetivo del estudio fue determinar la prevalencia de anticuerpos de lengua azul en ovinos de la Décima Región y analizar los resultados

con algunas variables relacionadas con el manejo de esta especie.

Material y Método

Se recolectaron 1.427 muestras de sangre de ovinos provenientes de 78 rebaños de la Décima Región del país, entre agosto de 1983 y agosto de 1984. Las muestras se obtuvieron por venipuncura yugular mediante sistema de vacío (Venoject^R, Terumo Corporation, Tokio, Japón). Una vez separados los sueros se almacenaron a -20°C, hasta el momento de ser utilizados. Se recopilaron de los propietarios algunos antecedentes ambientales de los animales, los que fueron confrontados con los resultados de laboratorio.

La técnica de diagnóstico utilizada fue la prueba de inmunodifusión en agar, descrita por Jochim (10) y modificada por este mismo autor (1982, comunicación personal). Se registró como suero negativo cuando las líneas de precipitación del suero control positivo se dirigían dentro del orificio de la muestra de suero.

Los sueros positivos fueron aquellos en que las líneas de precipitación positiva se curvaba hacia el orificio del antígeno.

Todos los sueros débilmente positivos fueron reexaminados. El antígeno y el suero control fueron donados por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S.D.A.).

Resultados

Los rebaños estudiados y sus animales muestreados fueron clasificados según tamaño de la explotación (Tabla 1). Treinta y un rebaños (39.7%) de los 78 muestreados presentó a lo menos un animal positivo. Noventa y tres animales (6.5%) de los sueros recolectados fueron positivos a la prueba de inmunodifusión.

El porcentaje más alto de animales positivos (7.7%) fue detectado en las explotaciones con menor número de ovinos.

La distribución de sueros según sexo y edad se presenta en la Tabla 2. Doce (7.2%) de los 166 machos y 81 (6.4%) de las 1.261 hembras fueron positivos. El porcentaje de hembras positivas varió entre un 3.4% para aquellas de ocho dientes y 10.8% para las de dos dientes.

Los rebaños ovinos y sus animales positivos según sistema de explotación se presentan en la Tabla 3. El porcentaje mayor de rebaños (64.3%) y de animales (12.8%) positivos se presenta en explotaciones de tipo extensivo, caracterizadas por poseer hasta dos ovinos adultos por hectárea. El menor porcentaje de positivos, tanto para rebaños (24.4%) como para animales (2.6%) positivos se presenta en las explotaciones de carácter intensivo.

La Tabla 4 presenta los rebaños y animales positivos distribuidos según estación del año. El 73% (19) de los 26 rebaños muestreados durante las estaciones de verano y otoño fueron positivos. El 23.1% (12) de los 52 predios muestreados durante las estaciones de invierno y primavera fueron positivos.

Tabla 1 - Distribución de anticuerpos de lengua azul en 1.427 ovinos según tamaño de explotación

Tamaño de la explotación (Nº animales)	Nº de rebaños muestreados	Rebaños positivos Nº %	Nº de animales muestreados	Animales positivos Nº %
Pequeño (1-200)	70	25 35.7	808	62 7.7
Mediano (201-1000)	3	1 33.3	195	3 1.5
Grande (más de 1000)	5	5 100	424	28 6.6
Total	78	31 39.7	1.427	93 6.5

Tabla 2 - Distribución de anticuerpos de lengua azul de 1.427 ovinos según edad y sexo.

Símbolos: * Dientes de leche = Aprox. menor de 1 año; 2 dientes = Aprox. 1 año; 4 dientes = Aprox. 2 años; 6 dientes = Aprox. 3 años; 8 dientes = Aprox. 4 años y boca quebrada = aprox. 5 y/o más años

Edad* (Según cronometría dentaria de incisivos)	Sexo					
	Machos positivos Nº	%	Total Machos	Hembras positivas Nº	%	Total hembras
Dientes de leche	2	33.3	6	1	5.0	20
2 dientes	2	7.7	26	19	10.8	176
4 dientes	0	0.0	15	24	7.9	305
6 dientes	1	2.4	41	17	9.0	189
8 dientes	7	13.5	52	11	3.4	327
Boca quebrada	0	0.0	14	9	5.52	163
Total	12	7.2	166	81	6.4	1.261

Tabla 3 - Distribución de anticuerpos de lengua azul en 1.427 ovinos según sistema de explotación

Sistema de explotación	Nº de rebaños muestreados	Rebaños positivos Nº	Rebaños positivos %	Nº de animales muestreados	Animales positivos Nº	Animales positivos %
Extensivo (hasta 2 ovinos adultos/Há)	14	9	64.3	164	21	12.8
Intermedio (más de 2 ovinos adultos/Há y hasta 5 ovinos adultos/Há)	23	12	52.5	529	53	10.0
Intensivo (más de 5 ovinos adultos/Há)	41	10	24.4	734	19	2.6

El 13.6% (70) de los 513 animales muestreados durante las estaciones de verano-otoño fueron positivos y negativos el 2.5% (23) de 914 ovinos muestreados durante el período invierno-primavera.

Discusión

Los resultados del presente trabajo son concordantes con estudios realizados en otras partes del continente, en el sentido que se ha detectado la presencia de anticuerpos, sin haber existido antecedentes de animales con signos clínicos de la enfermedad (6, 8).

La prueba de inmunodifusión es simple de realizar, sensitiva, confiable y detecta anticuerpos comunes al grupo de抗ígenos del virus de lengua azul (1, 5, 10). La prueba ha sido usada ampliamente para muestreo serológico en diferentes países (3, 6, 14). Un estudio realizado en bovinos en la misma área determinó que 64/100 predios y 343/3817 animales fueron positivos (16).

Son escasos los antecedentes de la susceptibilidad de ovinos respecto a tamaño de la explotación y sexo. Los resultados obtenidos sugieren una mayor susceptibilidad en aquellas de mayor tamaño, no habiendo aparentemente diferencias de sexo.

Susceptibilidad relacionada con edad ha sido informada para lengua azul en

Tabla 4 - Distribución de anticuerpos de lengua azul en 1.427 ovinos según estación del año

ovinos. Cox (2) señala que todas las razas y edades de los ovinos son susceptibles a lengua azul y que los ovinos jóvenes de alrededor de un año de edad son los más susceptibles. Luedkey y col. (12), sin embargo, encontró que ovejas de cinco años de edad eran más susceptibles que los corderos. Gibbs y col. (6) no encontró diferencias en la distribución de animales con anticuerpos dentro de los grupos de edad.

En el presente estudio, anticuerpos de lengua azul se encontraron en ovejas de todos los grupos de edad (Tabla 2).

En relación a sistema de explotación, Tamayo y col. (16) encontró que 23/30 y 41/69 rebaños bovinos manejados en forma intensiva y extensiva respectivamente, fueron positivos. Este trabajo presentó una marcada diferencia de predios positivos en aquellos cuyo sistema de explotación era intensivo. Un alto porcentaje de rebaños muestreados durante los meses de verano-otoño fueron positivos, lo que coincide con lo descrito por diversos autores respecto a la ocurrencia estacional de lengua azul (5, 9, 14). Sin embargo, en relación al vector, son escasos los estudios en Chile de la familia Ceratopogonidae, habiéndose descrito la presencia de *Culicoides pectipennis* en la zona central, siendo desconocido su rol como portador del virus (15).

La zona en estudio se caracteriza por ser de clima templado y lluvioso.

Se concluye, que es necesario realizar estudios que permitan aclarar la epidemiología de la enfermedad incluyendo el aislamiento no sólo del agente sino también del o los vectores potencialmente involucrados.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr. M. Jochim, U.S.D.A., Arthropod-Borne Animal Diseases Research, Denver, Colorado, por la gentileza en el abastecimiento de los reactivos y el constante apoyo al trabajo.

Referencias

1. Barber, T.L.; Osburn, B. & Stott, J. - What's new in bluetongue research. California Veterinarian, 2:28-31, 1979.
2. Cox, H.R. - Bluetongue. Bact. Rev., 18:239-253, 1954.
3. Eisa, M.; Karrar, A.E. & Abd Elrahim, A.H. - Incidence of bluetongue virus precipitating antibodies in sera of some domestic animals in the Sudan. J. Hyg. Camb., 83:539-545, 1979.
4. Erasmus, B.J. - Bluetongue in sheep and goats. Aust. Vet. J., 51:165-170, 1975.
5. Gibbs, E.P. - Bluetongue: an analysis of current problems, with particular reference to importation of ruminants to the United States. J. Am. Vet. Assoc., 182:1190-1194, 1983.
6. Gibbs, E.P.; Greiner, E.C.; Alexander, F.C.; King, T.H. & Roach, C.J. - Serological survey of ruminant livestock in some countries of the Caribbean region and South America for antibody to bluetongue virus. The Vet. Rec., 113:446-448, 1983.
7. Grocock, C.M. & Campbell, C.H. - Can. J. Comp. Med., 46:160-164, 1982.
8. Homan, E.J.; Lorbacher, H.; Donato, A.; Taylor, W. & Yuill, T.M. - Bluetongue virus infection in Costa Rican and Colombian cattle. In: - Proceedings of an International Symposium of Bluetongue and Related Orbiviruses. 1985.

9. Howel, P.G. - Lengua azul. En: - Enfermedades de importancia naciente de los animales. Estudios Agropecuarios, nº 61, FAO, Roma, 1964.
10. Jochim, M.M. - Improvements in the AGP test for bluetongue. Proc. Ann. Meet. Amer. Assoc. Vet. Lab. Diagn., 19:361-376, 1976.
11. Kennedy, P.C. - Some aspects of bluetongue in the United States. Aust. Vet. J., 44:191-194, 1968.
12. Luedke, A.J.; Bowne, J.C.; Jochim, M.M. & Doyle, C. - Clinical and pathologic features of bluetongue in sheep. Am. J. Vet. Res., 25:963-970, 1964.
13. Metcalf, H.E. & Luedke, A.J. - Bluetongue and related diseases. Bov. Practitioner., 15:188-193, 1980.
14. Osburn, B.I.; McGowan, B.; Heron, B.; Loomis, E.; Bushnell, R.; Stott, J. & Utterback, W. - Epizootiologic study of bluetongue: virologic and serologic results.. Am. J. Vet. Res., 42:884-887, 1981.
15. Stuardo, C. - Catálogo de los dípteros de Chile. Santiago de Chile, Imprenta Universitaria, 1946.
16. Tamayo, R.I.; Alonso, O. & Schoebitz, R. - Anticuerpos de lengua azul (bluetongue) en bovinos: primer informe en Chile. Arch. Med. Vet., 15:49, 1983.
17. U.S.D.A. - The riddle of bluetongue. Agricultural Res. U.S.D.A. Sci. Educ. Adm., 28:4-9, 1980.
18. Watson, W.A. - The import and export of sheep and goats. Br. Vet. J., 140:1-21, 1984.

COMPARAÇÃO ENTRE AS TÉCNICAS DE FILTRAÇÃO E CENTRIFUGAÇÃO NO ISO-LAMENTO DE *YERSINIA ENTEROCOLITICA* A PARTIR DE ÁGUA

Angela Corrêa de Freitas

Marly Paiva Nunes

& Ilvan Delgado Ricciardi

Deptº de Microbiologia Médica

Instituto de Microbiologia UFRJ

Caixa Postal 68040

21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

A utilização da técnica de centrifugação (16.300g por 10 min) em 50 amostras de água do mar analisadas, permitiu a recuperação de *Yersinia enterocolitica* em 64% dos experimentos. A técnica de filtração em membrana Millipore (0,45µm), usada comparativamente como método padrão, possibilitou o sucesso de isolamento em apenas 8% dos exames. O método de centrifugação, associado a um enriquecimento do sedimento, demonstrou ser eficiente, simples e prático para o isolamento de *Yersinia* sp. a partir de ambientes aquáticos naturais.

Summary

Comparison of filtration and centrifugation techniques for isolation of Yersinia enterolitica from water

Centrifugation (16.300g/10min) of 50 samples of sea water led to the isolation of *Yersinia enterocolitica* in 64% of the experiments. Filtration in Millipore membranes (0,45µm) used in comparison as a standard method allowed the isolation in only 8% of the attempts. The technique of centrifugation associated to the enrichment of sediment proved to be efficient, simple and practical for the isolation of *Yersinia* sp. from natural aquatic environments.

A metodologia recomendada para o isolamento de microrganismos encontrados em águas, inclusive *Yersinia* sp., é a técnica de filtração em membranas tipo Millipore de poro 0,45µm, diâmetro de 47mm, adaptada a um porta filtro HydroSol Stainless Millipore Cat. N° XX2004720, submetido a pressão negativa (APHA - American Public Health Association, 1976). O emprego desta técnica implica na utilização de membranas importadas e, consequentemente onerosas para experimentos que processem grandes volumes de água. Partindo desta notação, realizou-se um estudo comparativo entre esta metodologia padrão e a técnica de centrifugação (16.300g/10min) empregada para o isolamento de *Y. enterocolitica* a partir de alimentos (Tibana, A. - Tese de Doutorado, Inst. De Microb. UFRJ, 1981). Inicialmente, trabalhou-se com um volume de 10000ml de água do mar esterilizada em filtros Seitz e contaminada artificialmente com uma suspensão contendo 5×10^7 células viáveis de *Y. enterocolitica* sorotipo 0:3. Dez alíquotas de 1000ml foram assepticamente separadas e processadas equitativamente para as duas técnicas em questão, sendo as membranas e os sedimentos suspensos em 5ml de salina tamponada (PBS pH 7,4). Após período de enriquecimento a frio (4°C) por 7 dias, uma alcada de cada suspensão foi semeada em

meios de ágar MacConkey e ágar desoxicolato citrato, incubados a 25°C por 48 horas. As colônias recuperadas foram identificadas por provas bioquímicas convencionais (Stumph, M.; Ricciardi, I.D.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Bernhoeft, M., Rev. Bras. de Pesquisas Med. e Biol., 11:383-384, 1978).

Os resultados revelaram uma percentagem de recuperação de *Yersinia enterocolitica* em 64% dos experimentos ensaiados através da técnica de centrifugação e apenas 8% quando foi utilizada a técnica de filtração em membrana.

Em uma segunda etapa, associou-se à técnica de centrifugação o enriquecimento do sedimento em salina tamponada adicionada de sorbitol-bile-peptona (Weagant, S.D. & Kaysner, C.A., Appl. Environ. Microbiol., 45:468-471, 1983), para o isolamento de *Yersinia* sp. a partir de oito redutos aquáticos naturais localizados na cidade do Rio de Janeiro.

Desses redutos foram coletados, no correr do ano, 64 amostras de água dos quais obteve-se sucesso no isolamento de *Yersinia* sp. em 26 oportunidades (42,2%). Em algumas das coletas, particularmente as realizadas no verão, foram obtidos isolamentos em 100% das amostras processadas.

Assim, o emprego da técnica de centrifugação de amostras de água, associada a um enriquecimento do sedimento, revelou ser bastante eficiente, simples e prático para o isolamento de *Yersinia* sp. a partir de ambientes aquáticos naturais.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIGÊNICOS ISOLADOS A PARTIR DE LEITE DE VACAS MASTÍTICAS

Sirdeia Maura Perrone Furlanetto

Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
05508 São Paulo SP, Brasil

Antonio Nader Filho

Deptº de Higiene Veterinária e Saúde Pública
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP
Campus de Jaboticabal
Rodovia Carlos Tonanni, Km 5
14870 Jaboticabal SP, Brasil

Donald Wilson

Deptº de Nutrição
Faculdade de Saúde Pública USP
Caixa Postal 80
01000 São Paulo SP, Brasil

& Rubens Pablo Schocken-Iturrino

Deptº de Microbiologia
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias UNESP

Resumo

Foram submetidas ao "California Mastitis Test" (CMT) 468 vacas pertencentes a 6 rebanhos produtores de leite tipo B da região do Município de Barretos, São Paulo. Diante de resultados positivos ou suspeitos, foi colhido leite dos quartos reagentes e realizada a pesquisa e identificação de *S. aureus*. As cepas isoladas foram submetidas à verificação da capacidade produtora de enterotoxina dos tipos A, B, C, D, e E. Das 468 fêmeas analisadas, 56 (11,94%) foram reagentes ao CMT. Destas, 25 (44,6%) amostras de leite revelaram-se positivas para cepas de *S. aureus*, 2 (8,0%) das quais apresentaram-se como produtoras, concomitantemente, de enterotoxinas dos tipos A e E.

Summary

Enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from milk of mastitic cows

Four-hundred and sixty-eight cows belonging to six herds which produced B type milk, in the region of Barretos, São Paulo, Brazil, were submitted to the "California Mastitis Test" (CMT). Milk samples were collected from reagent quarters both positive and suspect and cultures for *Staphylococcus aureus* were performed. The strains that were isolated were submitted to A, B, C, D and E enterotoxine producing capacity tests. Of the four-hundred and sixty-eight cows studied forty-six (11,94%) were reagent to CMT.

Of these, 25 (44,6%) were positive for *S. aureus* of which two (8,0%) produced enterotoxine types A and E.

Introdução

O leite cru procedente de fêmeas infectadas representa perigoso veículo de infecção para o homem, podendo ser transmitidas doenças como a brucelose, tuberculose, febre Q, carbúnculo, estafilococias e estreptococcos entre outras (30).

É importante salientar que existe a possibilidade do leite de fêmeas mastíticas, nas formas clínica ou sub-clínica, ser incorporado ao leite de vacas normais (25).

A infecção da glândula mamária é sempre ascendente a partir do canal galactóforo, desenvolvendo-se, geralmente, um processo inflamatório decorrente de traumatismos verificados, principalmente, durante a ordenha, seguida de infecção que ocorre como um fenômeno natural (27, 30).

O *S. aureus* é o agente etiológico mais frequentemente isolado a partir de vacas mastíticas em todo o mundo (12). Vários autores estudaram as "bacias leiteiras" de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Pernambuco e da região de Barretos em São Paulo. A percentagem de positividade para *S. aureus* encontrada variou de 50 a 59,2% (11, 13, 16, 20, 22).

Wilson (32) estudou a contaminação por *S. aureus* de leite proveniente da bacia leiteira de Paraibuna, no Estado de São Paulo e concluiu que o leite estava altamente contaminado por *S. aureus* e que as "linhas de leite" ofereciam todas as condições necessárias ao crescimento desta bactéria. Preconizou medidas no sentido de se prevenir a multiplicação microbiana nesse produto.

De acordo com Hobbs & Gilbert (17), apesar do *S. aureus* ser encontrado na maior parte das amostras de leite cru e, também, em produtos lácteos preparados com leite não aquecido ou aquecido ligeiramente, não são frequentes os relatos de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica ocasionados pela ingestão destes alimentos.

O *S. aureus* presente no leite cru, pode representar um risco à saúde do consumidor, pelo fato de algumas cepas desta bactéria produzirem enterotoxinas termoestáveis capazes de provocar intoxicação alimentar. Esta intoxicação pode ocorrer após a ingestão de leite e derivados crus ou pasteurizados, bastando, para tanto, que o produto contaminado com *S. aureus* enterotoxigênico tenha permanecido à temperatura favorável à multiplicação dessa bactéria, durante um tempo suficiente para a formação de quantidades de enterotoxina capazes de provocar tal doença de origem alimentar (10, 14, 21, 24, 29).

O leite que contém a enterotoxina estafilocócica, apresenta sabor e odor normais sendo, portanto, consumido sem que haja qualquer suspeita da presença desse produto tóxico. A enterotoxina produzida no leite, pode manter-se em diversos produtos derivados, tais como leite em pó, sorvetes e queijos (23).

Segundo Aranalde & col. (3), embora sejam poucos os casos notificados de intoxicação alimentar estafilocócica provocados pela ingestão de leite e derivados, existe a possibilidade da ocorrência de surto desta intoxicação.

Dante do exposto, e dada a falta de estudos a respeito, em nosso país, planejou-se esta investigação com o objetivo de se verificar a presença de *S. aureus* enterotoxigênico em leite de vacas com prova positiva ou suspeita ao "California Mastitis Test" (CMT) (26).

Material e Métodos

Foram submetidas ao CMT 468 vacas pertencentes a 6 rebanhos produtores de leite tipo B, da região do Município de Barretos, São Paulo.

Dante de resultados positivos ou suspeitos foram colhidos 50ml de leite dos quartos reagentes, assepticamente, em tubos de ensaio estéreis (22). Em seguida, as amostras foram colocadas em caixas de material isotérmico (isopor), contendo cubos de gelo, e transportadas para o laboratório, onde se efetuaram o isolamento e identificação de cepas de *S. aureus*.

Isolamento e identificação de S. aureus - 10ml de leite foram transferidos, assepticamente, para um tubo estéril, de forma cônica, procedendo-se a seguir a centrifugação a 3.000rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e, com alça de níquel-cromo, o sedimento espalhado na superfície de ágar Baird-Parker e ágar *Staphylococcus* nº 110, em placas (American Public Health Association) (1). Após incubação a 37°C por 24 e 48 horas, procedeu-se ao isolamento de colônias suspeitas de *S. aureus* (no ágar Baird-Parker colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação circundada por halo de transparência e no ágar *Staphylococcus* nº 110, colônias amareladas ou brancas).

As colônias isoladas foram semeadas em tubos com ágar simples inclinado, as quais permaneceram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após a incubação, foram preparados esfregaços corados pelo método de Gram, para a verificação da morfologia das cepas isoladas. A seguir, as que se revelaram como cocos Gram-positivos dispostos em cachos foram submetidas às provas de verificação da produção de catalase (Harrigan & McCance) (15), fermentação - oxidação da glicose (Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococcii (28), produção de DNase (Di Salvo) (8), de coagulase livre (ICMSF) (18), e de TNase (Lachica & col.) (19).

Pesquisa da capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas - Na produção de enterotoxina foi empregada a técnica de cultura de *S. aureus* em saco de celofane, de acordo com Donnelly & col. (9). Por outro lado, na verificação da presença de enterotoxina nos extratos obtidos, empregou-se a prova de imunodifusão pelo método da "sensibilidade ótima em placas, OSP" (18) utilizando-se como padrão as enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D, E, assim como, as respectivas anti-enterotoxinas, gentilmente cedidas pelo Prof. Merlin S. Bergdoll, do Food Research Institute da Universidade de Wiscousin, EUA.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos referem-se à ocorrência de casos de mastites subclínicas, uma vez que, nos rebanhos estudados não foi constatada, ao exame clínico, a presença de fêmeas com sintomas da doença.

De acordo com a Tabela 1, das 468 fêmeas analisadas, 56 (11,94%) foram reagentes ao CMT. Das fêmeas reagentes e pertencentes a seis rebanhos produtores de leite tipo "B", as amostras de leite de 25 (44,6%) revelaram-se positivas para *S. aureus*. Destas, em 2 (8,0%) foi constatada a presença de cepas produtoras, concomitantemente, de enterotoxinas dos tipos A e E. Coincidetemente, estas cepas foram isoladas de leite de fêmeas pertencentes ao mesmo rebanho.

A frequência de isolamento de cepas produtoras de enterotoxina estafilocócica observada pode ser considerada baixa, atendendo-se para o fato de que a bactéria

Tabela 1 - Distribuição dos resultados obtidos no "California Mastitis Test" (CMT), número e percentagem de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas, número e tipo de cepas enterotoxigênicas

Rebanhos	Fêmeas examinadas	CMT reagentes	Fêmeas positivas		Cepas enterotoxigênicas
			Nº	%	
1	42	10	2,13	1	1,78
2	30	7	1,49	4	7,14
3	61	11	2,35	5	8,92
4	73	7	1,49	5	8,92
5	86	7	1,49	4	7,14
6	176	14	2,99	6	10,71
Total	468	56	11,94	25	44,61

deve multiplicar-se e produzir, no alimento, níveis de enterotoxina capazes de ocasionar quadro de intoxicação alimentar. Nossos achados podem refletir o que é referido por Hobbs & Gilbert (19), ou seja, que não são comuns ocorrências de casos de intoxicação alimentar estafilocócica em que o alimento envolvido é o leite. Isto pode ser devido também ao fato de o leite de vacas infectadas com *S. aureus* enterotoxigênico ser misturado ao produto obtido a partir de animais não infectados. Com isto, mesmo havendo multiplicação da bactéria com produção de enterotoxina, ao serem os leites processados nas usinas de pasteurização são misturados, obtendo-se a diluição da própria enterotoxina, que pode atingir níveis insuficientes para ocasionar intoxicação alimentar, mesmo não sendo destruída pelo processo de pasteurização.

A baixa positividade para cepas de *S. aureus* enterotoxigênicas obtidas na presente pesquisa, está de acordo com o que foi observado por Araújo (4). Este autor, analisando 100 amostras de leite cru verificou que 50% revelou-se positiva para *S. aureus*, porém, das 201 cepas isoladas apenas uma (0,5%), oriunda de uma amostra cuja contagem da bactéria foi de 860/ml, revelou-se produtora de enterotoxina e do tipo B.

Entretanto, têm sido relatados na literatura surtos de intoxicação alimentar estafilocócica através da ingestão de leite. Assim, Anderson & Stone (2) descrevem a ocorrência de oito surtos que atingiram 1.190 crianças em diferentes escolas na Inglaterra, nos meses de junho a setembro de 1953. Verificaram os autores que em todos os surtos estudados estava implicado leite em pó desnatado obtido em diferentes origens. Este alimento apresentou sempre altos números de *S. aureus* pertencentes ao fagótipo 42 E/53 W, várias vezes associado a casos de intoxicação alimentar.

Armijo & col. (5) descreveram surtos ocorridos em Porto Rico, em 1956, no período de um mês, nos quais 775 crianças participantes de um programa de merenda escolar, foram acometidas de uma toxinfecção alimentar em que as evidências epidemiológicas e clínicas incriminavam o leite em pó desnatado que havia sido consumido. Apesar dos testes bacteriológicos e toxicológicos terem sido negativos, todas as evidências levaram a crer que o provável agente causador desses surtos foi o de *S. aureus* enterotoxigênico.

O *S. aureus* enterotoxigênico pode mostrar-se presente no leite e derivados crus ou pasteurizados. Assim, Casmann & col. (7) estudando a capacidade enterotoxigênica de 236 cepas de *S. aureus* isoladas de leite crú, verificaram que 6,0% eram produtoras de enterotoxina do tipo D, 1,0% do A, 0,8% do B e 0,4% dos tipos C, AC, AD e CD, concomitantemente. Os autores verificaram, também, que de 51 cepas isoladas de vacas portadoras de mastite, 2,0% eram produtoras de enterotoxina do tipo D.

Wieneke (31), estudando a capacidade enterotoxigênica de cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos e de humanos, verificou que de 63 isoladas de queijo tipo "cheddar", sete mostraram-se produtoras de enterotoxina. A maioria (71,4%) foi produtora de enterotoxina estafilocócica do tipo D, porém, 14,3% foram produtoras de enterotoxinas dos tipos AC e 14,3% dos BC. Neste mesmo estudo a autora verificou, também, que de 50 cepas isoladas de leite cru, 3 revelaram-se produtoras de enterotoxina do tipo D.

No Brasil, Cabral (6) analisando amostras de queijo coalho comercializado no Município de João Pessoa, Paraíba, verificou que 74,0% das amostras estudadas foram positivas para *S. aureus*. Segundo a autora, algumas amostras revelaram-se com números elevados desta bactéria que poderiam ser devidos a uma contaminação maciça do leite usado no preparo do alimento. Nesse trabalho, das amostras examinadas, a autora verificou que 9 (18,0%) amostras continham cepas de *S. aureus* enterotoxigênico, sendo 5 (10,0%) com cepas produtoras de enterotoxina do tipo B, 2 (4,0%) do A, uma (2,0%) dos AC e uma (2,0%) dos AE, concomitantemente.

Pelos dados citados na literatura e resultados obtidos nesta pesquisa verificamos que existe a necessidade de cuidados a serem dispensados ao rebanho leiteiro, no sentido de se evitar, sempre que possível, a mistura do leite de fêmeas infectadas ao leite de fêmeas sadias.

O leite recém obtido deve sempre ser mantido em baixas temperaturas, até o instante da pasteurização, para impedir a multiplicação de *S. aureus* e consequente

produção de enterotoxina, que poderia constituir-se em uma ameaça à saúde do consumidor.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association - Compendium of methods for the examination of foods. Washington, 1976.
2. Anderson, P.H.R. & Stone, M.D. - Staphylococcal food poisoning associated with spray-dried milk. *J. Hyg.*, 53:387-397, 1955.
3. Aranalde, A.A.; Martin, L.F.; Ziegler, J.C. - Ocorrência de *Staphylococcus* coagulase-positiva no leite cru da bacia leiteira de Pelotas, R.S. R. Centro Ci. Rur.. Sta. Maria, 4:155-158, 1974.
4. Araújo, W.P. - *Staphylococcus aureus* em leite cru: produção de enterotoxina e caracterização da origem provável, humana ou bovina, a partir das cepas isoladas. São Paulo, Universidade de São Paulo, USP, Instituto de Ciências Biomédicas, 1984.
5. Armijo, R.; Henderson, D.A.; Tinothée, R. & Robinson, B.H. - Food poisoning outbreaks associated with spray-dried milk: an epidemiologic study. *Am. J. Public Health*, 47:1093-1100, 1957.
6. Cabral, T.M. de A. - Coliformes totais e fecais e *Staphylococcus* enterotoxigenico em queijo "coalho" comercializado no Município de João Pessoa, Pb. Paraíba, Universidade Federal da Paraíba, UFPb, Centro de Tecnologia, 1983.
7. Casmann, E.P.; Bennett, R.W.; Dorsey, A.E. & Issa, J.A. - Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin. *Enterotoxin D. J. Bact.*, 94:1875-1882, 1967.
8. Di Salvo, G.W. - Desoxyribonuclease and coagulase activity of micrococci. *Med. Techn. Bull.*, 9:191-196, 1958.
9. Donnelly, C.B. - Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. *Appl. Microbiol.*, 15:1382-1387, 1967.
10. Elliker, P.R. - Practical dairy bacteriology. 4.ed. New York, McGraw-Hill, 1949.
11. Fernandes, J.C.T.; Moojen, V. & Ferreiro, L. - Agentes etiológicos das mastites bovina na bacia leiteira de Porto Alegre, RS, Brasil. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, 1:41-46, 1973.
12. Ferreiro, L.; Santos, E.C.; Silva, N. - Ocorrência e etiologia da mastite bovina na "Zona da Mata" do Estado de Minas Gerais. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 33:31-37, 1981.
13. Figueiredo, J.B. - Estudo sobre a mamite bovina no Município de Betim, MG. *Arq. Esc. Vet. UFMG*, 15:258-294, 1962.
14. Gomes, A.C.M. - O leite: estudo bromatológico. II - Indústria de caseina e da lactose. Ouro Preto, Escola Pharmacia, 1916. (Tese-Cátedra).
15. Harrigan, W.F. & Mc Cance, M. - Laboratory methods in microbiology. 4.ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1969.
16. Haroop, M.H.V.; Pereira, L.J.V.; Brito, J.R.F. & Melo, A.M.B. - Incidência da mastite bovina na bacia leiteira da zona meridional agreste PE. *Pesq. Agrop. Bras.*, 10:65-67, 1975.
17. Hobbs, B.C. & Gilbert, R.J. - Food poisoning & food hygiene. 4.ed. London, Edward Arnold, 1978.
18. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microorganisms in foods. 1 - Their significance and methods of enumeration. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
19. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprinch, P.D. - Metachromatic agar-diffusion methods for detectivy staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971.
20. Langenegger, J.; Coelho, M.M.; Langenegger, C.H. & De Castro, R.P. - Estudo de incidência da mastite bovina na bacia leiteira do Rio de Janeiro. *Pes. Agrop. Bras.*, 5:437-540, 1970.
21. Leão, R.L. - Higiene do leite: o leite como veiculador de infecções no homem, e medidas para assegurar sua inocuidade. São Paulo, Sec. da Agricultura, Indústria e Comércio, 1937.

22. Nader Filho, A. - Prevalência da mastite bovina: estudo comparativo de métodos para sua detecção e do comportamento de vários agentes etiológicos frente à prova da redução do azul de metileno. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, 1983. (Tese de Doutoramento).
23. Olson Jr., J.C. & Mocquot, G. - Milk and milk products. In: - International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Microbial ecology of foods: food commodities. New York, Academic Press, v.2. p.470-478.
24. Riemann, H. & Bryan, F.L. - Food-borne infections and intoxications. 2.ed. New York, Academic Press, p.247-287, 1969.
25. Santos, E.C. & Moreira, H.H. - Influência da mastite induzida por enterotoxina estafilocócica no teor de gordura do leite bovino. Arq. Esc. Vet. UFMG, 28:181-187, 1976.
26. Schalm, O.W. & Noorlander, D.D. - Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Amer. Vet. Med. Res., 130:199-204, 1957.
27. Schmidt, G.H. - Biología de la lactación. España, Zaragoza, Acribia, 1971.
28. Subcommittee on Taxonomy of Staphylococci and Micrococci - Minutes of First Meeting, 5th - 6th October, 1964. Inst. Bull. Bact. Nomencl., 15:107-108, 1965.
29. Tiedman, W. - Food sanitation: milk products. In: - Maxcy, K.F. - Preventive medicine and public health. 8.ed. New York, Appleton, p.840-883, 1956.
30. Tolle, A. - A monograph on bovine mastitis. A. Bull. Inst. Dairy Fed., 1:23, 1971.
31. Wieneke, A.A. - Enterotoxin production by strains of *S. aureus* isolated from foods and human beings. J. Hyg., 73:255-262, 1974.
32. Wilson, D. - Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em leite a ser pasteurizado. Rev. Saúde Pública (São Paulo), 11:1-11, 1977.

OUTBREAK OF STAPHYLOCOCCAL ENTEROTOXIN B FOOD POISONING

Alba Lúcia Solino Noleto
 & Anita Tibana

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

Summary

An outbreak of staphylococcal food poisoning involving 61 persons is described. A *Staphylococcus aureus* enterotoxin B producer was isolated from meat stuffed with sausage, following an outbreak of enteritis. The incubation period ranged from 2 to 7 hours; 6 persons were hospitalized.

Resumo

Surto de intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica B

Um surto por intoxicação estafilocócica acometeu 61 pessoas. A partir de carne assada recheada com paio, foram isoladas culturas de *Staphylococcus aureus* produtores de enterotoxina B. O período de incubação variou de 2 a 7 horas e 6 pessoas foram hospitalizadas.

Enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* are one of the most important causes of food poisoning in the United States and Canada (4, 9, 13); this type of food poisoning has been infrequently reported in developing countries. Enterotoxins are extracellular products of *S. aureus* that causes gastroenteritis when ingested with the contaminated food. The enterotoxins are designated enterotoxins A through E (SEA, SEB, etc), according to their antigenic specificities (1, 2, 3, 5, 6). An outbreak involving SEB is presented here. In April 1986, an outbreak occurred from food served in three restaurants supplied from a central kitchen in Rio de Janeiro. In the first restaurant 600 meals were served and 58 persons were affected with six persons hospitalized. In the second restaurant 320 meals were served with one person becoming ill and in the third restaurant, 500 meals were served with 2 persons affected. The symptoms reported were vomiting, diarrhoea and headache with incubation periods from two to seven hours. Meat stuffed with sausage was the food item implicated in the illness.

The meat implicated in this outbreak was homogenized with 0,1% peptone water and colony plate counts of *S. aureus* were made on Baird-Parker medium. The isolates were tested for coagulase and thermonuclease production (10). The production of enterotoxin by individual colonies was made as described by Hallander (8) and the method of Robbins & col. (11) was used for the detection of enterotoxins. 2×10^7 CFU/g of coagulase and thermonuclease positive *S. aureus* were isolated from the meat. Staphylococcal enterotoxin B was produced by all 10 colonies isolated.

Staphylococci are particularly tolerant of low moisture levels and relatively high concentrations of salt (7) with salt cured ham (3,5% salt) or salt pork as common vehicles for growth of enterotoxigenic staphylococci (9). Apparently the meat implicated in the outbreak reported here provide ideal conditions for the

staphylococci to grow and produce enterotoxin. It appears that the heat treatment applied to the meat was inadequate to destroy all of the staphylococci present in the meat. The staphylococci remaining had adequate time to grow to sufficient numbers, as indicated by the numbers isolated, to produce enterotoxin before the meat was served.

Staphylococcal enterotoxin A is the enterotoxin most commonly involved in staphylococcal food poisoning with SEB seldom involved. In the USA, SEA was identified in 27 of 29 outbreak while SEB was identified in only 2 of the 29 outbreak (9). However, 46% of the individuals ill in the SEB outbreaks were hospitalized while only 5% of the individuals ill in the SEA outbreaks were hospitalized. In the outbreak reported here, 9.8% of the ill persons were hospitalized.

The results presented here indicate that enteritis due to *S. aureus* could be very common in our environment. Methods effective in preventing food poisoning should be developed.

Acknowledgments

We are grateful to M.S. Bergdoll for kindly supplying staphylococcal enterotoxins and antiserum. Part of this study was supported by grants awarded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

References

1. Bergdoll, M.S.; Borja, C.R. & Avena, R.M. - Identification of a new enterotoxin as enterotoxin. *Can. J. Bacteriol.*, 90:1481-1485, 1965.
2. Bergdoll, M.S.: Borja, C.R.; Robbins, R.N. & Weiss, K.R. - Identification of enterotoxin E. *Infect. Immun.*, 4:593-595, 1971.
3. Bergdoll, M.S.; Surgalla, M.J. & Dack, G.M. - Staphylococcal enterotoxin identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin neutralizing property. *J. Immunol.*, 83:334-338, 1959.
4. Center for Disease Control - Foodborne and waterborne disease outbreaks. Annual summary for 1975. New Publication No. (CDC), 76:8185, 1976.
5. Casman, E.P. - Further serological studies of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl. Microbiol.*, 13:181-189, 1960.
6. Casman, E.P.; Bennett, A.; Dorsey, A.E. & Issa, J.A. - Identification of a fourth staphylococcal enterotoxins, enterotoxin D. *J. Bacteriol.*, 94:1875-1882, 1967.
7. Christiansen, L.N. & Walther, J.A. - The water relations of staphylococci and micrococci. *J. Appl. Bacteriol.*, 25:367-377, 1962.
8. Hallander, H.O. - Production of large quantities of enterotoxin B and others staphylococcal enterotoxins on solid media. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 63:299-305, 1965.
9. Holmberg, S.D. & Blake, P.A. - Staphylococcal food poisoning in the United States. *JAMA*, 251:487-489, 1984.
10. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar-diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. *Appl. Microbiol.*, 21:585-587, 1971.
11. Robbins, R.; Gould, S. & Bergdoll, M.S. - Detecting the enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Microbiol.*, 28:946-950, 1974.
12. Smith, J.L.; Buchanan, R.L. & Palumbo, S.A. - Effects of food environment of staphylococcal enterotoxin synthesis: a review. *J. Food Protect.*, 46:545-555, 1983.
13. Todd, E.C.D. - Foodborne disease in Canada: a 5 years summary. *J. Food Protect.*, 46:650-657, 1983.

SCREENING OF MILK-CLOTTING MICROORGANISMS*

Gecernir Colen**

Jacques Robert Nicoli

& Enio Cardillo Vieira

Deptº de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas UFMG
Caixa Postal 2486
30161 Belo Horizonte MG, Brasil

Summary

From a total of 20 cultures of fungi and bacteria isolated from soil and milk by-products, eight strains (five molds and three bacteria) were screened for their milk-clotting activity. Milk-clotting enzyme was invariably found to be associated with proteolytic activity in fungal and bacterial isolates. However the two enzymatic activities seem to be independent. There was considerable variation in the ratio of the two enzymatic activities from strain to strain and from medium to medium for a same strain. An *Aspergillus* and a *Bacillus* strains were selected for the ratio milk-clotting: proteolytic activities and for the milk-clotting production, respectively.

Resumo

Seleção de microrganismos coagulantes do leite

Do total de 20 culturas de fungos e bactérias isoladas do solo e de produtos de laticínios foram selecionados 8 microrganismos (5 fungos e 3 bactérias) por sua atividade coagulante de leite. Essa atividade estava invariavelmente associada à ação proteolítica, nos isolados fúngicos e bacterianos. Contudo, as duas atividades enzimáticas parecem ser independentes. Houve variação considerável, na relação entre as duas atividades de uma linhagem para outra e de um meio de cultura para outro, para a mesma linhagem. Uma linhagem de *Aspergillus* e outra de *Bacillus* foram selecionadas pela relação entre a atividade coagulante sobre o leite e a atividade proteolítica e pela produção da atividade coagulante do leite, respectivamente.

Introduction

Calf-rennet is the most common milk-clotting enzyme used in cheese manufacture. The growing demand of the cheese industry and the increasing scarcity of calf rennet have stimulated the search for clotting enzymes from alternative sources. Microbial rennets are proteolytic enzymes produced by microorganisms which are able to induce the coagulation of milk in a way similar to that of animal rennets. Production of enzymes using microbial strains is generally attractive because of

* This work was extracted from the M.S. thesis of the first author.

** Present address: Fundação Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro, 80 - 30.000 Belo Horizonte MG, Brazil.

high titers of active compounds and shorter fermentation time for production. In spite of these advantage, efforts to develop a commercial fermentation of microbial rennets have not been sucessful because of the invariable strong and non-specific proteolytic action of milk-clotting enzymes with consequent losses of fat and nitrogen in the whey, reduced yield, and poor quality of the aged cheese (6). Milk-clotting preparations from strain of *Endothia parasitica*, *Mucor miehei*, and *Mucor pusillus* var. Lindt account for almost all of the commercial microbial rennets in the world (7).

This work describes the isolation and selection of milk-clotting microorganisms and the influence of medium formulation on the enzyme production.

Material and Methods

Isolation of fungi and bacteria - Samples of soil and milk by-products were diluted in 250ml of sterile distilled water and homogenized. A 1ml aliquot of this suspension was spread into selective media for the cultivation of bacteria and fungi. Culture plates of each medium were incubated at 30°C for five days. After incubation, colonies were selected and purified. Purified cultures were grown on the maintenance medium and kept at 4 °C. Identification of the isolates was determined according to Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (3) or Barnett & Hunter (1) for bacteria and fungi, respectively. The plating media employed for the isolation and maintenance were Potato Dextrose Agar (pH 5,6) and Potato Dextrose Agar plus 0,3% yeast extract (pH 6,5) for fungi and bacteria, respectively.

Screening for milk-clotting enzymes - The screening medium for milk-clotting activity contained the following components in g/l: Skimmilk, 40; sucrose, 1; yeast extract, 3; and CaCO₃, 5. The selection of microorganisms was based on milk-clotting ability at a maximum of five hours at 30°C.

Assay for protease activity - The proteolytic activity was followed by milk-clotting and casein digestion methods.

Milk-clotting method - Milk-clotting activity was determined according to the method of Berridge (2). Five ml of 10% aqueous solution of skimmilk powder containing 0.01M CaCl₂ was added to 5ml of 0.1M acetate buffer (pH 5,0). The milk and the buffer were equilibrated for one hour in a water bath at 30°C. Then 1.0ml of enzymatic preparation at the same temperature was added and the time (T) required for coagulation to occur was observed. Usually the mean of duplicate readings was recorded. The milk coagulation activity was given by: Milk coagulation activity/100ml= 100 x d/T x 100, where d = dilution of enzymatic preparation.

Casein digestion method - A stock solution of 1% (w/v) casein (Hammerstein, Merck) dissolved in 0.1M phosphate buffer, pH 7,6, was used for this purpose. An aliquot of 0.2ml of the enzymatic preparation was added to 1.0ml of casein solution and the reaction continued for 20 min at 35°C. The enzyme activity was stopped by adding 3.0ml of 5% trichloroacetic acid (TCA). The mixture was allowed to stand for about 10 min and the undigested casein was removed by filtering through blue ribbon filter paper. The absorbance of the TCA-soluble product in the filtrate was measure spectro-photometrically at 280nm. An appropriate blank was used. One unit of enzyme activity was defined as that which gives rises, under the conditions described, to an increase of 1 unit of absorbance at 280nm (5)

Submerged cultures - For flask scale experiments, spores from four maintenance slants of bacteria or fungi, previously grown for 14 days at 30°C, were suspended in 100ml of sterile distilled water. Ten ml of the spore suspension were inoculated into 100ml of the medium in a 500ml flask. Flasks were incubated at 30°C for 96 hours on a reciprocating water bath with 160 translations per min.

At appropriate time intervals, samples were withdrawn from flask. Each sample was

centrifuged and the supernatant was used for enzymatic determinations.

Shake flask cultures were grown in the following media (g/l): Medium I: skimmilk, 40; sucrose, 1; yeast extract, 3; and CaCO_3 , 1; Medium II: medium I plus proteose-peptone, 1; Medium III: potato infusion, 1000ml; sucrose, 1; yeast extract, 3; CaCO_3 , 5; Medium IV: medium III plus proteose-peptone, 1; Medium V: medium II without CaCO_3 ; Medium VI: medium IV without CaCO_3 .

Results and Discussion

Twenty strains were isolated (four bacteria, one yeast, and fifteen fungi) and evaluated for their milk-clotting ability and for proteolytic activity. Of the isolates, five strains of molds and three strains of bacteria were screened for their milk-clotting activity in a maximum of 5 hours. Tables 1 and 2 show respectively the milk-clotting and proteolytic activities of the isolates in various media after 96 hours of shake flask culture. Milk-clotting enzymes were invariably accompanied by proteolytic activity but the reciprocal is not true. This fact and the non-proportional variations of both activities in various media suggest that the two enzymatic activities are independent. In fungi, a greater proteolytic activity was accompanied by a greater sporulation. Bacteria were better and more stable milk-clotting and proteolytic enzyme producers than fungi and the bacterial isolate B₁₀, grown in medium II, showed the higher production of these enzyme activities. However this isolate yielded curd with loose texture. The cause of loose clot may be due to the high proteolytic activity. Proteolytic activity, beneficial up to a certain point, may cause problems of bitter taste, softening of texture, and decrease of cheese yield (8).

Table 3 shows the ratio milk-clotting to proteolytic activity. The better ratio was observed for the isolate F₁ grown in medium V. Isolates F₁ (fungi) and B₁₀ (bacteria) were selected for the better ratio of milk-clotting to proteolytic activities and the greater milk-clotting production, respectively, and grown in shake flask culture. Figure 1 shows that the milk-clotting activity of the isolate appeared after the proteolytic activity, confirming that these activities are independent in fungi (4). There is a lag phase of about 60 hours prior to a consistent production of both enzymes. Probably for the protease secreted by *Aspergillus niger* (9), the proteolytic and milk-clotting enzymes of these strains are not produced in association with microbial growth. The isolates F₁ and B₁₀ were identified as *Aspergillus* sp. and *Bacillus* sp. respectively.

This work reports the screening of milk-clotting microorganisms from soil and milk-products isolates and the influence of medium formulation on enzyme production. Cheese making trials are suggested to

Table 1 - Influence of medium formulation on milk-clotting activity (Activity/100ml) of the isolates.

Symbols: ND = Not detected; B = Bacteria; F = Fungi

Isolates	Medium					
	I	II	III	IV	V	VI
F ₁	ND	ND	ND	ND	55,00	1,47
F ₂	ND	ND	ND	ND	ND	4,17
F ₃	ND	ND	ND	ND	7,20	ND
F ₄	ND	ND	ND	ND	ND	ND
F ₈	ND	ND	ND	ND	40,00	3,33
B ₅	18,00	20,00	8,20	6,00	4,00	ND
B ₉	27,00	41,00	3,00	3,30	33,00	ND
B ₁₀	41,00	166,00	ND	5,50	83,00	ND

Table 2 - Influence of medium formulation on proteolytic activity (U/100ml) of the isolates.

Symbols: ND = Not detected; B = Bacteria; F = Fungi

Isolates	Medium					
	I	II	III	IV	V	VI
F ₁	ND	ND	6,50	41,00	20,00	45,00
F ₂	ND	6,00	22,50	15,00	17,50	120,00
F ₃	ND	ND	19,00	55,00	47,50	12,50
F ₄	50,00	ND	ND	12,50	6,50	15,00
F ₈	250,00	ND	17,50	10,00	25,00	81,00
B ₅	775,00	370,00	17,50	50,00	37,50	7,50
B ₉	975,00	625,00	66,50	42,50	675,00	ND
B ₁₀	1.112,00	1.200,00	ND	125,00	966,00	17,50

Table 3 - Influence of medium formulation on the relation between milk-clotting and proteolytic activities of the isolates.

Symbols: B = Bacteria; F = Fungi

Isolates	Medium					
	I	II	III	IV	V	VI
F1	-	-	-	-	2,75	0,03
F2	-	-	-	-	-	0,03
F3	-	-	-	-	0,15	-
F4	-	-	-	-	-	-
F8	-	-	-	-	1,60	0,04
B5	0,02	0,05	0,47	0,12	0,11	-
B9	0,03	0,06	0,04	0,08	0,05	-
B10	0,04	0,14	-	0,04	0,09	-

evaluate the effects of the enzymatic preparation on cheese quality and yields.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Centro de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Figure 2 - Milk-clotting (o) and proteolytic (x) activities of the isolate G₁₀ grown in medium II

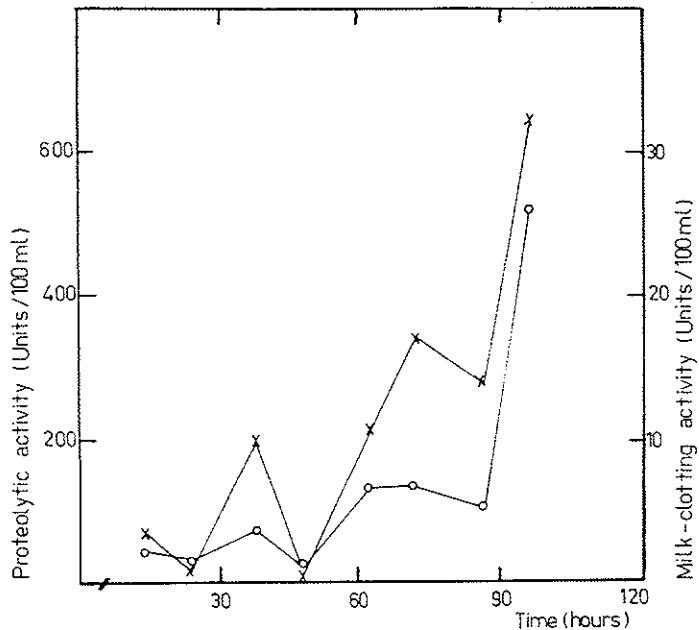
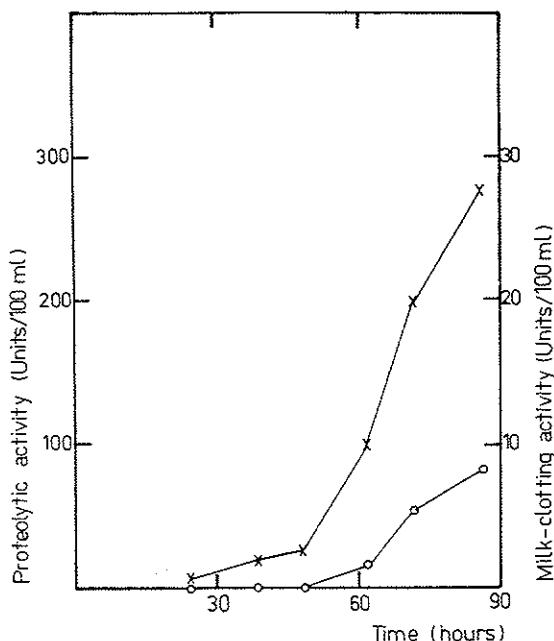


Figure 1 - Milk-clotting (o) and proteolytic (x) activities of the isolate G₁ grown in medium V



References

1. Barnett, H.L. & Hunter, B.B. - Illustrated genera of imperfect fungi. 3.ed. Minneapolis, Burgess, 1972.
2. Berridge, N.J. - The purification and crystallization of rennin. Biochem. J., 39:179, 1945.
3. Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1974.
4. Krishnaswamy, M.A.; Nagaraja, K.S.; Screekanthiah, K.R. & Mannar, M.C. - Production of fungal rennet substitute for cheese making. J. Food Sci. Technol., 13:187-191, 1976.
5. Kunitz, M. - Crystalline soybean trypsin inhibitor. J. Gen. Physiol., 30:291-310, 1947.
6. McMahon, D.J. & Brown, R.J. - Effects of enzyme type on milk coagulation. J. Dairy Sci., 68:628-632, 1985.
7. Sardinas, J.L. - New sources of rennet. Process Biochem., 4:13, 1969.
8. Shaker, K.A. & Brown, R.J. - Proteolytic and milk-clotting fractions in milk-clotting preparations. J. Dairy Sci., 68:1939-1942, 1985.
9. Shimyo, A.; Okasaki, M. & Tami, G. - Kinetic studies on enzyme production by microbes. V - Process kinetics of acid protease production by *Aspergillus niger*. J. Ferment. Technol., 46:1000-1006, 1980.

PREFERENTIAL UTILIZATION OF GLUCOSE DURING BATCH FERMENTATION OF WHEY BY *LACTOBACILLUS BULGARICUS*

Susana Bertold Baralle*

Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo S.A. - IPT
Caixa Postal 7141
01051 São Paulo SP, Brasil

& Walter Borzani**

Instituto Mauá de Tecnologia
Estrada das Lágrimas, 2035
09580 São Caetano do Sul SP, Brasil

Summary

Two phases were observed in batch fermentation of unsterilized whey by *Lactobacillus bulgaricus*. During the first phase the lactose was hydrolysed by the bacterial cells and glucose was immediately fermented, while galactose accumulated in the fermenting medium. During the second phase the galactose was assimilated by the microorganisms. Cells growth occurred only at the beginning of the first phase.

Resumo

*Utilização preferencial da glicose na fermentação descontínua de soro de leite por *Lactobacillus bulgaricus**

Em fermentações descontínuas, por *Lactobacillus bulgaricus*, de soro de leite não esterilizado, foram observadas duas fases. Na primeira, a lactose foi hidrolisada pela bactéria e a glicose foi imediatamente fermentada, acumulando-se galactose no meio em fermentação. Na segunda fase, a galactose foi assimilada pelo microrganismo. Somente no começo da primeira fase observou-se crescimento celular.

Introduction

The lactic fermentation of whey by *Lactobacillus bulgaricus* was recently studied (1, 6, 8, 12, 13) with the purpose to produce a ruminant feed supplement rich in crude protein (3, 4).

During the process, the lactic acid produced by the bacterial cells is continuously neutralized by adding NH₃ (or ammonium hydroxide solution) in order to maintain a constant pH value. The fermented medium is then completely neutralized and concentrated, leading to the feed supplement.

No information were found, however, regarding the mechanism of sugars utilization by *L. bulgaricus* during the fermentation of whey.

The main purpose of the present paper is to show that two phases exist in batch fermentations of whey by *L. bulgaricus*. During the first phase, the bacterial cells

* Present address: Jeronimo Salguero, 3028/59 Piso, 1425 Buenos Aires, Argentina.

**To whom reprints request should be addressed.

hydrolyse all the lactose and ferment the glucose, while in the second phase the microorganism ferment the galactose.

Materials and Methods

Preparation of the inoculum - 20mg of lyophilized cells of *L. bulgaricus* were added to a 250ml erlenmeyer flask containing culture medium (10g of skim milk powder and 90g of tap water) previously sterilized (115°C; 15 min). The inoculated flask was incubated at 40–42°C for 15h.

Raw material - Dehydrated whey containing 73% lactose, 13% protein, 9% mineral substances, 1% fat and <4% moisture, was used in all the experiments.

Preparation of the fermentation medium - Suitable quantities of the dehydrated whey were dissolved in tap water at 40°C in order to obtain the desired lactose concentrations (21.6 to 82.0 g l⁻¹). Yeast extract (2.0 or 4.0 g l⁻¹) was then added to the mash. The medium was not sterilized.

Fermentation tests - The fermentation experiments were carried out in a non-sterilized 7-liter New Brunswick fermenter, containing 2l of the medium and 200ml of inoculum, under the following experimental conditions: temperature, 44–45°C; pH, 5.4–5.5 (automatically controlled by the addition of 233–278 g l⁻¹ ammonium hydroxide solution); impeller speed, 200 min⁻¹. The volume of ammonium hydroxide solution added to the fermenter was measured by means of a calibrated tube connected to the pH control device.

Analytical determinations - Total sugars concentrations (calculated as lactose) were determined by the method described by Montgomery (9). Lactose concentrations were measured by the method proposed by Nickerson & col. (10). Lawrence's method (7) was used to determine lactic acid concentrations. Glucose concentrations were measured by the hexokinase method (Technicon International Division). Bacterial cells counting were carried out by the method of Breed as described by Behmer (2). Paper chromatography (5) was used to detect sugars in the fermenting medium.

Results

Figures 1/2 show typical results obtained in our fermentation tests. No glucose was detected in the fermenting medium during all the process. A proportionality was observed between the volume of ammonium hydroxide solution added to the fermenter in order to control the pH and the quantity of lactic acid produced by the bacteria (Fig. 3).

Figure 1 - Results obtained under the following experimental conditions: initial value of $S = 20.3 \text{ g.l}^{-1}$; initial yeast extract concentration = 4.0 g.l⁻¹; concentration of the ammonium hydroxide solution = 278.3 g.l⁻¹. The arrows indicate the results of paper chromatographic analysis (LAC = lactose; GAL = galactose)

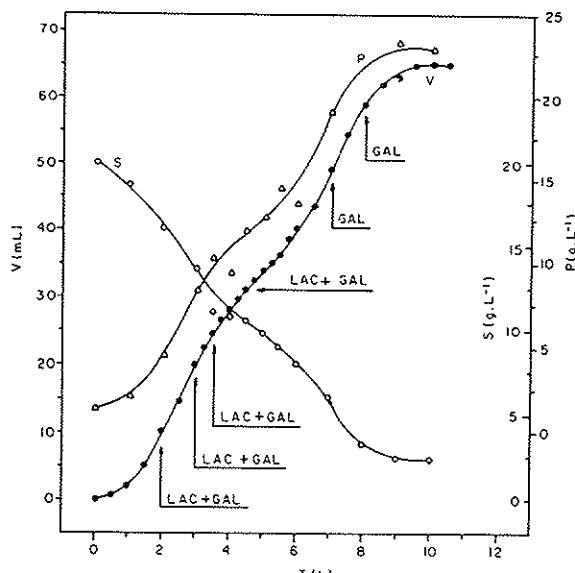
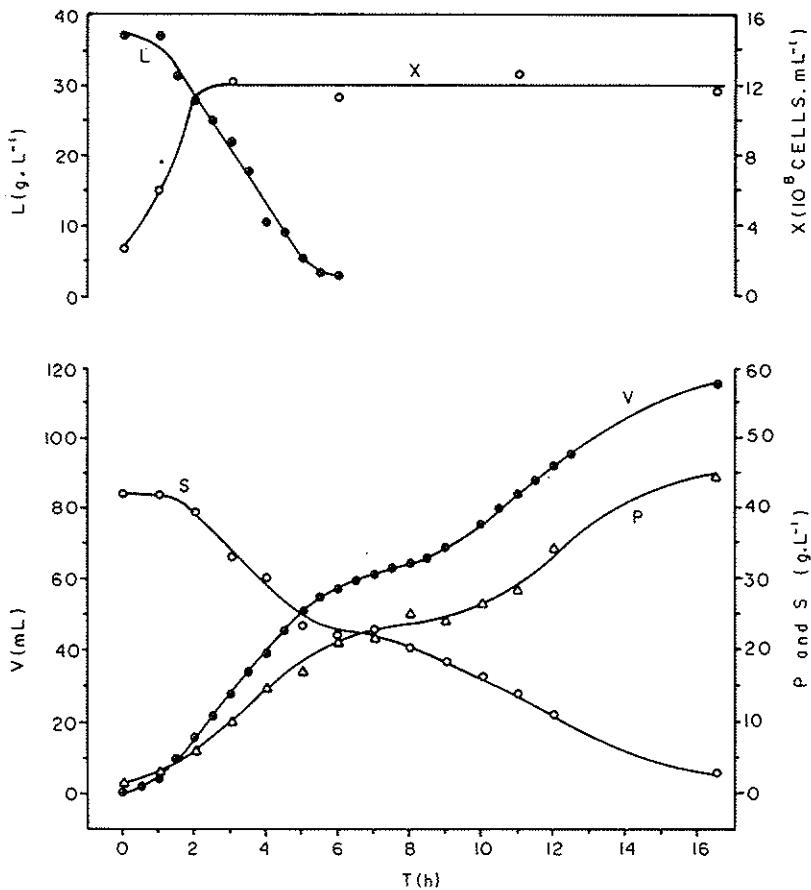


Figure 2 - Results obtained under the following experimental conditions: initial value of $L = 37.4 \text{ g.l}^{-1}$; initial value of $S = 42.1 \text{ g.l}^{-1}$; initial cells concentration = $2.7 \times 10^8 \text{ cells.ml}^{-1}$; initial yeast extract concentration = 2.0 g.l^{-1} ; concentration of the ammonium hydroxide solution = 266.1 g.l^{-1}



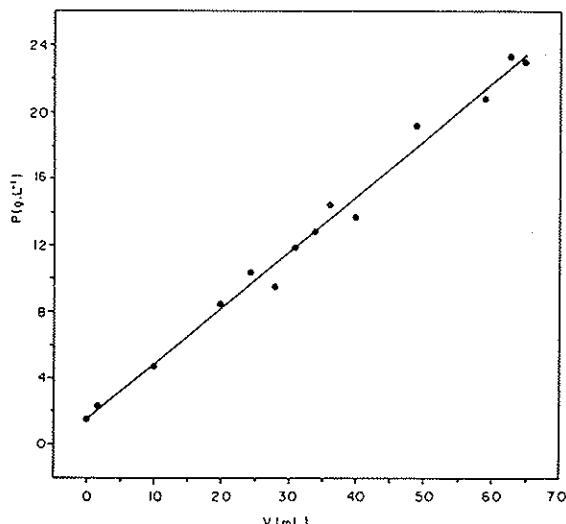
Discussion

Figures 1 and 2 clearly show two distinct phases in the fermentation of whey by *L. bulgaricus*. During the first one, lactose was hydrolysed (Fig. 2) producing glucose and galactose; the glucose was immediately fermented while the galactose accumulated in the culture medium (Fig. 1). During the second phase the galactose was fermented by the bacterial cells. Cells growth was observed only at the beginning of the first phase (Fig. 2) and the cells concentration remained then constant until to the end of the fermentation, leading to the conclusion that almost all the lactic acid was produced by non-growing cells.

The above facts could be explained based on the results obtained by O'Leary & Woychik (11) in experiments of lactose fermentation by *Streptococcus thermophilus*. They stated (11) that lactose was intracellularly hydrolysed by the bacteria; the produced glucose was immediately utilized by the microorganisms while the galactose was accumulated in the fermenting medium. The intracellular glucose probably repressed the synthesis of enzyme responsible for the galactose

Figure 3 - Correlation between the quantity of lactic acid (P) produced by the bacteria and the volume of ammonium hydroxide (V) added to the fermenter in order to control the medium pH. Experimental conditions: initial value of S = 20.3 g.l⁻¹; initial yeast extract concentration = 4.0 g.l⁻¹; concentration of the ammonium hydroxide solution = 278.3 g.l⁻¹

metabolism (11). After the glucose consumption the above synthesis was not anymore repressed and the galactose was fermented.



Nomenclature

- L - Lactose concentration in the fermenting medium;
- P - Lactic acid concentration in the fermenting medium;
- S - Total sugars concentration (calculated as lactose) in the fermenting medium;
- T - Time;
- V - Volume of ammonium hydroxide solution added to the fermenter;
- X - Cells concentration in the fermenting medium.

Acknowledgement

This work was supported, in part, by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

References

1. Arnott, D.R.; Patton, S. & Kesler, E.M. - A method for manufacturing a high-nitrogen-low-lactose product from whey. *J. Dairy Sci.*, 41:931-941, 1958.
2. Behmer, M.L.A. - *Tecnologia do leite*. 10.ed. São Paulo, Livraria Nobel, 1980.
3. Gerhardt, P. & Reddy, C.A. - Conversion of agroindustrial wastes into ruminant feedstuff by ammoniated organic acid fermentation: a brief review and preview. *Dev. Ind. Microbiol.*, 19:71-78, 1978.
4. Huber, J.T.; Boman, P.L. & Henderson, H.E. - Fermented ammoniated condensed whey as a nitrogen supplement for lactating cows. *J. Dairy Sci.*, 59:1936-1943, 1976.
5. Jeanes, A.; Wise, C.S. & Dimler, R.J. - Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.*, 23:415-420, 1951.
6. Keller, A.K. & Gerhardt, P. - Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:997-1018, 1975.
7. Lawrence, A.J. - A rapid method of estimation of lactic acid in skim milk powder. *Austr. J. Dairy Technol.*, 25:198-200, 1970.
8. Marshall, K.R. - The production of lactic acid from whey by continuous culture as a possible means of waste disposal. New Zealand, 1972. (Ph.D. Thesis).
9. Montgomery, R. - Further studies of the phenol-sulfuric acid reagent for carbohydrates. *Biochem. Biophys. Acta.*, 48:591-593, 1961.
10. Nickerson, T.A.; Vujicic, I.F. & Lin, A.Y. - Colorimetric estimation of lactose and its hydrolytic products. *J. Dairy Sci.*, 59:386-390, 1976.

11. O'Leary, V.S. & Woychik, J.H. - Utilization of lactose, glucose and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:89-94, 1976.
12. Reddy, C.A.; Henderson, H.E. & Erdman, M.D. - Bacterial fermentation of cheese whey for production of a ruminant feed supplement rich in crude protein. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32:769-776, 1976.
13. Stieber, R.W. & Gerhardt, P. - Continuous process for ammonium-lactate fermentation of deproteinized whey. *J. Dairy Sci.*, 62:1558-1566, 1979.

QUANTIFICAÇÃO DA COENZIMA F₄₂₀ EM LODO ANAERÓBIO PROVENIENTE DA BIODIGESTÃO DE VINHOTO DE CANA*

Suely V. Ferreira**

Iracema M. da Silva

& Hebe L. Martelli

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

Resumo

O método de avaliar a atividade metanogênica de lodos anaeróbios através da determinação da concentração do fator F₄₂₀ por fluorimetria foi aplicado a lodo proveniente de dois biodigestores alimentados com vinhoto de cana. A curva padrão entre concentração do fator e as unidades fluorimétricas apresentou linearidade entre 0₂ e 11_{µg} de F₄₂₀. A concentração do fator nos lodos variou de 15,7 a 17,9 e 6,0 a 12,5_{µg} de F₄₂₀ por grama de sólidos voláteis após 4 tempos de residência hidráulica.

Summary

Quantification of the coenzyme F₄₂₀ in anaerobic sludges from sugar cane stillage biodegradation

Fluorimetric determination of the coenzyme F₄₂₀ concentration in the anaerobic sludge from biodigester fed with sugar cane stillage was assayed and found feasible as a mean to evaluate its methanogenic activity. The calibration curve was linear between 0₂ and 11_{µg} of F₄₂₀. The factor concentration in the biodigestors increased from 15,7 to 17,9 and 6,0 to 12,5_{µg} F₄₂₀ per gram of volatile solids after 4 hydraulic retention times.

Introdução

O fator F₄₂₀ é uma das coenzimas que as bactérias metanogênicas tem a capacidade de sintetizar. Trata-se de uma coenzima de transporte de elétrons, que caracteriza-se pela intensa fluorescência verde azulada que apresenta, quando na sua forma oxidada, e exposta à luz ultra-violeta (5). Esta propriedade é devida a sua constituição flavínica. Tal fluorescência é tão característica que tem sido utilizada na determinação da concentração do F₄₂₀ em lodos anaeróbios para estimar a atividade metanogênica no mesmo.

Neste trabalho procurou-se reproduzir o método fluorimétrico proposto por Binot & col. (2) a fim de acompanhar a atividade metanogênica no lodo durante a biodigestão

*Auxiliado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq e CAPES.

**Parte da tese, para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

anaerobiose de vinho.

Material e Métodos

Amostras - Lodos de biodigestores alimentados com vinho proveniente da fermentação alcoólica de caldo e melaço de cana.

Condições do processo - Foram utilizados lodos de dois biodigestores que operaram em regime de batelada alimentada cíclica com tempo de retenção hidráulica de 10 dias cujo volume útil e volume inicial de lodo foram: biodigestor 1: Vreator (L) = 6.60; V útil (L) = 6.00; biodigestor 2: Vreator (L) = 7.60; V útil (L) = 6.30.

A operação dos biodigestores está descrita em publicações anteriores (3, 4).

Curva padrão - Para traçar a curva padrão relacionando a concentração do fator F420 e a fluorescência foi utilizada uma solução aquosa de 2,5µg/litro da coenzima pura cedida pelo Dr. G.D. Vogel da Universidade de Nijmegen, Holanda. A medida da fluorescência foi feita em aparelhos Jobin Yvon Spectrofluor JY3.

O procedimento seguido para a obtenção da curva foi: diluição da solução de F420 puro de forma a obter as seguintes concentrações em µg/litro: 0.0775, 0.3875, 0.7750, 1.550, 2.2350, 3.100, 3.8750, 4.6500, 5.4250, 6.200, 6.9750, 7.7500; adição de 15ml de isopropanol e 2ml de solução de KOH 1N a 5ml de cada diluição; leitura da fluorescência em espectrofluorímetro em comprimento de onda de excitação de 425nm e de emissão de 470nm.

Procedimento seguido com as amostras - Homogeneização e pesagem da amostra; adição de água deionizada à amostra; centrifugação a 12.000g por 10 minutos (centrífuga Sorvall, rotor SS34, φ = 4,25 in); descarte do sobrenadante; ressuspensão em volume conhecido de água deionizada e manutenção da suspensão em banho-maria por 10 minutos; centrifugação a 12.000g por 10 minutos; adição de 15ml de isopropanol e 2ml de solução de KOH 1N a 5ml do sobrenadante; leitura da fluorescência em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda acima referidos.

Determina-se o teor de sólidos voláteis na amostra de forma a se obter a concentração da coenzima F420 por unidade de sólidos voláteis no lodo (µg F420/gSV). Os ensaios devem ser feitos em duplicata, segundo os métodos convencionais (1).

Resultados e Discussão

A curva padrão obtida apresentou linearidade na faixa de 2 a 11µg de F420/1 (Figura 1). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Binot & col. (2).

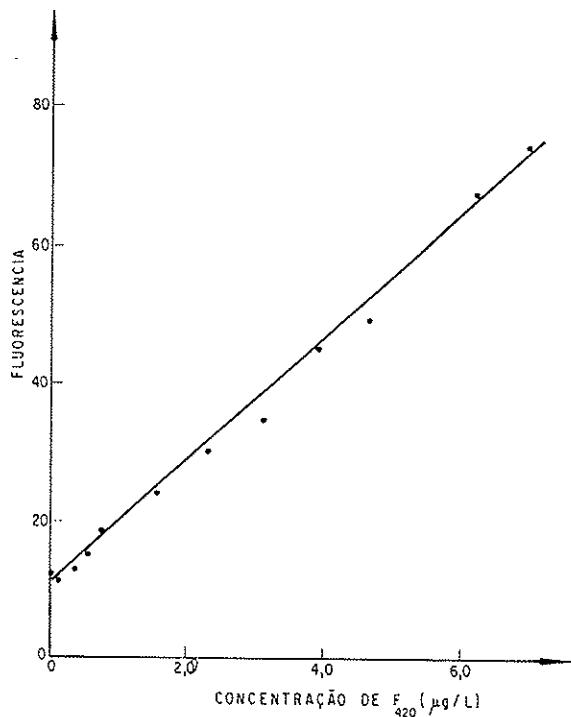
Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1. Não foram encontrados na literatura referências a determinações efetuadas por outros autores com lodo adaptado a vinho. Pode-se apenas referir Zeeuw & col. (1), que citam valores situados na faixa de 6 a 25nmol de F420 por grama de sólidos voláteis em suspensão e 0,7 a 2,0ml de metano por nmol de F420 por dia para lodo de esgoto.

Tabela 1 - Características e atividades dos lodos.

Símbolos: (*) TRH = Tempo de retenção hidráulica

	Biodigestor 1			Biodigestor 2		
	Inicial	Após 2 TRH(*)	Após 4 TRH	Inicial	Após 2 TRH	Após 4 TRH
Sólidos totais (% p/p)	10,00	10,40	8,00	7,40	9,60	7,20
Sólidos voláteis (% p/p)	60,70	60,00	60,20	64,00	63,00	61,00
Concentração do F420 (µg F420/g SV)	15,70	15,50	17,90	6,00	12,80	12,50
CF420 (mlCH ₄ /µg F420/dia)	0,51	0,63	0,60	0,70	1,00	1,10

Figura 1 - Curva de calibração



digerido. Entretanto, apesar dos dados citados não serem referentes ao vinhoto, os resultados com este resíduo se encontram numa mesma ordem de grandeza dos citados pelo referido autor, parecendo compatíveis.

Cabe destacar que as diferentes concentrações da coenzima F420 nas diferentes espécies de bactérias metanogênicas não tem impedido o uso deste método para estudos comparativos em um mesmo lodo visto que um lodo adaptado a determinado resíduo; será estabelecida uma flora que, provavelmente não apresentará mudanças significativas quanto às espécies pré-estabelecidas.

Os resultados mostram que este método pode ser também aplicado a lodos de biodigestores alimentados com vinhoto proveniente da fermentação alcoólica. Os dados obtidos são preliminares, tendo ainda muito a ser aprimorado, principalmente no que diz respeito à extração da coenzima.

Referências Bibliográficas

1. Analytical Techniques - Proceedings of the Second International Symposium of Anaerobic Digestion: poster session, 1981.
2. Binot, R.A.; Naveau, H.P. & Nyns, E.J. - Methanogenic potential activity of mixed liquors: fluorimetric monitoring. Biotech. Letters, 3:623-628, 1981.
3. Ferreira, S.V. - Isolamento e influência de bactéria produtora de hidrogênio em biodigestor alimentado com vinhoto de cana. Rio de Janeiro, Escola de Química, UFRJ, 1985. (Tese de Mestrado).
4. Ferreira, S.V.; Sérvelo, E.F.C.; Silva, I.M. da & Martelli, H.L. - Isolamento de bactérias produtoras de hidrogênio em biodigestores. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 15:86-88, 1984.
5. Zehnder, A.J.B.; Huser, B.A.; Brock, T.D. & Wuhrmann, K. - Characterization of an acetate-decarboxylating, non-hydrogen-oxidizing methane bacterium. Arch. Microbiol., 124:1-11, 1980.

MELHORAMENTO DE *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* POR DNA TRANSFORMANTE E FUSÃO DE PROTOPLASTOS, PARA PRODUÇÃO DE AMILASE E PROTEASES

Valter Roberto Linardi

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

& Yong Kun Park

Deptº de Bioquímica
Faculdade de Engenharia de Alimentos UNICAMP
Caixa Postal 6121
13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

Utilizando-se *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 2342 e o *B. natto*, isolado do produto comercial "natto", respectivamente, bons produtores de alfa-amilase e proteases, conseguiu-se aumentar os níveis de produção destas enzimas através das técnicas de DNA transformante e fusão de protoplastos. O melhoramento genético por transformação foi mais eficiente do que aquele por fusão de protoplastos.

Summary

Improvement of Bacillus amyloliquefaciens by DNA mediated transformation and protoplast fusion for amylase and proteases production

With two different species, *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 2342 and *B. natto*, isolated from the commercial product "natto", good producers of α -amylase and proteases, respectively, the level of production of these enzymes was increased using transformant DNA and protoplast fusion. The genetic improvement by transformation was found to be more efficient than that obtained by protoplast fusion.

Introdução

As alfa-amilases e proteases microbianas são enzimas de grande aplicabilidade industrial. As primeiras são utilizadas nas indústrias têxteis, de papel, de adesivos e alimentos (4) e as proteases microbianas em indústrias de alimentos, de couro e farmacêutica (2).

A produção extracelular de alfa-amilase por *Bacillus* é regulada por inúmeros genes, sendo mais significativos amyR, papM e tmr. O gene amyR regula a síntese da alfa-amilase e está ligado ao gene estrutural amyE (16). O gene papM regula a produção da alfa-amilase e protease e afeta algumas propriedades pleiotrópicas da bactéria (18). O gene tmr está envolvido com a resistência à tunicamicina e com o aumento de produção da amilase (12).

O gene regulador para *B. subtilis* foi designado amyR1 e os genes que conferem alta velocidade de síntese para alfa-amilase foram designados amyR2 e amyR3.

B. subtilis Marburg 6160 é portador do gene *amyR1* (16) e *B. subtilis* var. *amylosacchariticus* do gene *amyR3* (19). Na ausência de outros genes, o *amyR1* induz a produção de 10 unidades dextrinizantes/ml e o *amyR3* de 50 unidades/ml.

É possível introduzir genes que estão envolvidos com a produção de alfa-amilase através de experimentos com DNA transformante e, frequentemente, este procedimento resulta num aumento na produção da enzima (17).

Com poucas exceções, as proteases excretadas por *Bacillus* são proteases neutras (metaloenzimas) e proteases alcalinas (serino-proteases) (2).

A síntese da protease neutra pode ser regulada por um mecanismo semelhante aquele que controla a síntese de alfa-amilase. A protease neutra é codificada por um gene estrutural *nprE*, que é controlado pelo regulador *nprR*.

Os genes *nprR1* e *nprR2*, encontrados em *B. subtilis* e *B. natto*, respectivamente, direcionam a baixa e alta produção de protease neutra (14).

A análise genética da síntese de protease alcalina é complicada pela íntima associação com a esporulação (5).

A técnica de fusão de protoplastos tem sido um instrumento bastante útil na manipulação genética assexual de bactérias e fungos e, como tal, é uma técnica com grande potencialidade no melhoramento genético de microrganismos (15).

O presente trabalho propõe-se, usando DNA transformante e fusão de protoplastos, a obter linhagens estáveis e capazes de excretar proteases e amilases em maior escala. Pretende-se também comparar algumas propriedades das enzimas produzidas pelos recombinantes com aquelas produzidas pelas linhagens parentais.

Material e Métodos

Microrganismos - Utilizou-se *Bacillus amyloliquefaciens* ATCC 2342 e o *B. natto*, isolado do produto comercial "natto".

Experimentos com DNA transformante - Utilizou-se a técnica descrita por Yoshikawa (20). O DNA foi extraído do *B. natto* (Sm^r - estreptomicina resistente), em crescimento exponencial, pelo tratamento fenólico alcalino (11) e coletado com bastão de vidro após precipitação com etanol. As composições do meio de cultura para o *B. amyloliquefaciens*, como receptor, e meio mínimo para preparação de células competentes foram as mesmas descritas por Haas & Yoshikawa (3).

A mistura contendo DNA (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e a suspensão de células receptoras foram incubadas a 37°C por 40 minutos. Após incubação, as células foram inoculadas em ágar nutritivo contendo 1% de caseína e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina, usados como agentes seletivos.

Procedimento para fusão de protoplastos - A preparação de protoplastos e o procedimento de fusão foram os mesmos descritos por Pebernry (8).

As linhagens parentais foram cultivadas separadamente, sob agitação, em caldo nutritivo a 37°C até absorbância (A570) de 0,8. Após incubação, cada cultura foi centrifugada separadamente, e as células foram ressuspensas em SMMD (sacarose, malato, MgCl_2 acrescido de DNase). A lisozima foi adicionada a cada suspensão para uma concentração final de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

1,0ml de cada uma das suspensões de protoplastos foi misturado e centrifugado. O sedimento obtido foi ressuspensido em 0,2ml de SMMD. Em seguida, 1,8ml de polietileno glicol (peso molecular 6000) a 40% foi adicionado aos 0,2ml de células ressuspensas em SMMD. Após 10 minutos, 10ml de caldo nutritivo foram adicionados à mistura e incubados a 37°C por 24 horas. A seguir, as células foram inoculadas em ágar nutritivo contendo 1% de caseína e 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina. As células com halo de hidrólise, que se desenvolveram no meio seletivo, foram, posteriormente, quantificadas quanto à produção de alfa-amilase e proteases.

Determinação da atividade de alfa-amilase - As células bacterianas foram incubadas em meio de Saito (10) por três dias a 30°C, sob agitação a 150rpm. A seguir, a cultura foi centrifugada e o sobrenadante usado para determinar a atividade de alfa-amilase.

A atividade de alfa-amilase foi determinada pela medida do poder dextrinizante

usando-se o amido como substrato, de acordo com o método descrito por Medda & Chandra (6). Uma unidade dextrinizante (UD) foi definida com a quantidade de enzima capaz de hidrolisar 1,0mg de amido por minuto, a 50°C.

Determinação da atividade de proteases - Após incubação em meio glutamato-citrato (7) por 24 horas a 30°C, sob agitação, a suspensão de células foi centrifugada e o sobrenadante usado para determinar as atividades da protease neutra e alcalina pelo método do de Anson (1) modificado. 1,0ml de caseína a 0,6% em tampão fosfato a 0,05M, pH 7,0 ou tampão Tris-HCl a 0,1M, pH 9,0 foi misturado com 0,2ml do sobrenadante a ser testado. Após incubação da mistura a 40°C por 5 minutos, adicionou-se 1,0ml de ácido tricloroacético a 0,11M acrescido de ácido acético a 0,33M e acetato de sódio a 0,22M. A mistura foi mantida à temperatura ambiente por 30 minutos e a seguir centrifugada (14). 1,0ml do sobrenadante foi misturado com 2,0ml da NaOH a 0,5N e 0,6ml do reagente de Folin-Ciocalteau. A absorbância foi medida a 550nm. A tirosina foi utilizada como padrão e uma unidade de atividade proteolítica (AP) foi definida como a quantidade de enzima que libera 0,1mg/ml de tirosina por minuto nas condições descritas acima.

Cromatografia descendente em papel dos produtos de hidrólise do amido - Utilizou-se o papel Whatman nº1 e o sistema de solventes foi butanol: piridina: água, na proporção de 6:4:3 (v/v), respectivamente. Os açúcares redutores foram revelados com reagente de nitrato de prata (13).

Resultados e Discussão

O número dos recombinantes obtidos com DNA transformante foi maior, com melhor produção de alfa-amilase do que os obtidos por fusão de protoplastos (Tabelas 1 e 2). Isto indica maior eficiência da transformação na obtenção de recombinantes quando se está trabalhando com estas bactérias. Provavelmente, a baixa frequência na obtenção de recombinantes por fusão é devida à dificuldade de interação entre os cromossomos inteiros dos parentais, enquanto na transformação são pedaços de DNA que interagem com o genoma do receptor. O tipo de agente fusogênico usado também pode afetar a frequência dos recombinantes. Vidoli & col. (15) registraram aumento considerável na obtenção de recombinantes quando o gel de alginato de cálcio foi usado ao invés do PEG, nos experimentos de fusão. Os parentais *B. amyloliquefaciens* e *B. natto*, quanto à produção de amilase e proteases apresentam, respectivamente, os fenótipos AMI^a-PN^b-PA^b e AMI^b-PN^a-PA^a, indicando "a" alta produção e "b" baixa produção, respectivamente, de alfa-amilase (AMI) e proteases neutra (PN) e alcalina (PA), com prováveis genótipos: amyR2, nprR1, SmS para o *B. amyloliquefaciens* e amyR1, nprR2, SmR para o *B. natto* (Tabela 1). Para a síntese da amilase, os transformantes selecionados, dentre os 85 obtidos, podem ser divididos em dois grupos: os AMI^a e AMI^s, indicando "s" produção superior,

Tabela 1 - Produção de α-amilase e proteases por linhagens parentais e recombinantes, obtidas transformação. Total de transformantes obtidos: 85.

Símbolos: 1UD = Definido como a quantidade de enzima que hidrolisa 1mg de amido por minuto, a 50°C; 2AP(N) = Protease neutra; 3AP(A) = Protease alcalina, ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que libera 0,01μg/ml de tirosina por minuto, a 40°C; 4N/A = Razão entre AP(N) e AP(A)

Linhagens parentais	α-amilase UD/ml ¹	Proteases		N/A ⁴
		AP(N) ²	AP(A) ³	
<i>B. amyloliquefaciens</i>	42,0	1,8	1,5	1,2
<i>B. natto</i>	2,0	8,4	10,5	0,8
Transformantes				
T-4	55,0	5,7	3,0	1,9
T-5	55,0	4,2	1,8	2,3
T-12	55,0	6,0	2,4	2,5
T-14	52,0	5,7	3,3	1,7
T-15	52,0	5,5	3,1	1,8
T-18	55,0	3,6	2,5	1,4
T-20	55,0	2,7	2,0	1,3
T-30	70,0	4,8	3,6	1,3
T-39	44,0	7,2	5,4	1,3
T-41	74,0	6,0	4,2	1,4
T-47	70,0	4,5	1,8	2,5
T-49	74,0	3,0	1,2	2,5

observado nos transformantes T-30, T-41, T-47 e T-49 (Tabela 1).

Para a produção de proteases neutra e alcalina, a divisão em grupos é dificultada pela variação dos valores das atividades proteolíticas obtidas. Porém, quase todos os transformantes produziram mais proteases do que o receptor. Portanto, as características PNA-PA^a e SmF do *B. natto* foram transferidas para estas linhagens. Como o doador de DNA produz menos amilase (amyR1) do que o receptor (amyR2), era de se esperar que a produção dessa enzima pelos transformantes não fosse afetada. Como foi observado aumento na produção de amilase, fenótipo AMI^a, e duplicação na produção da enzima, fenótipo AMI^b, acreditamos na ação pleiotrópica de uma característica não identificada nos experimentos e que foi transferida do *B. natto* para os transformantes.

Os recombinantes T-41, bom produtor de alfa-amilase, T-39 e F-52, bons produtores de proteases, foram escolhidos para os estudos transformante T-41 apresentaram o perfil de produção para a alfa-amilase (Figura 1). A linhagem T-41 apresenta

Tabela 2 - Produção de α -amilase e proteases, por linhagens parentais e recombinantes, obtidas por fusão de protoplastos. Total de recombinantes obtidos: 42.

Símbolos: 1UD = Definido como a quantidade de enzima que hidrolisa 1mg de amido por minuto, a 50°C; 2AP(N) = Protease neutra; 3AP(A) = Protease alcalina, ambas unidades definidas como a quantidade de enzima que hidrolisa 0,01mg/ml de tirosina por minuto, a 40°C; 4N/A = Razão entre AP(N) e AP(A)

Linhagens parentais	α -amilase UD/ml ¹	Proteases AP(N) ²	AP(A) ³	N/A ⁴
<i>B. amyloliquefaciens</i>	42,0	1,8	1,5	1,2
<i>B. natto</i>	2,0	8,4	10,5	0,8
Recombinantes				
F-5	25,0	1,8	0,9	2,0
F-7	26,0	1,5	0,15	10,0
F-8	24,0	2,4	0,03	8,0
F-12	27,0	2,4	1,8	1,3
F-15	25,0	2,1	0,06	3,5
F-52	4,0	7,5	9,5	0,8

subsequentes. O *B. amyloliquefaciens* e o mesmo perfil de produção para a alfa-amilase autólise celular mais acentuada do que o receptor.

Figura 1 - Cinética de crescimento e produção da α -amilase.

Símbolos: (○—○) = Massa seca e produção de α -amilase; (Δ—Δ) = pelo *B. amyloliquefaciens* (A) e T-41 (B)

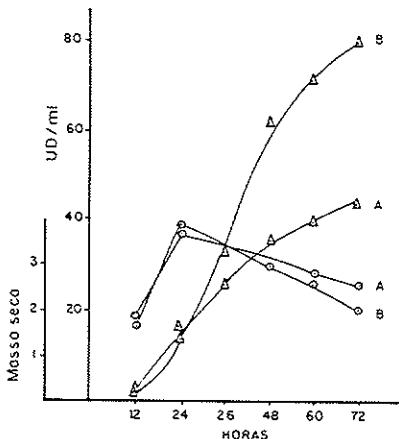
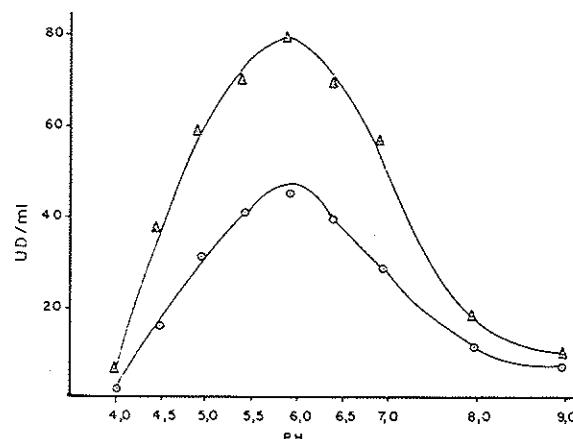


Figura 2 - Efeito do pH na atividade da α -amilase.

Símbolos: (○—○) = *B. amyloliquefaciens*; (Δ—Δ) = T-41



Estudos comparativos demonstraram que as amilases produzidas pelo receptor e T-41 apresentaram atividade ótima em pH 6,0 (Figura 2) e temperatura ótima a 65°C (Figura 3). A 60°C a enzima excretada pelo receptor foi praticamente estável durante 60 minutos, diferentemente do T-41, cuja atividade apresentou um declínio mais acentuado a partir de 40 minutos. O declínio em atividade foi mais marcante a 65°C (Figura 4). Portanto, o receptor produz alfa-amilase mais termoestável do que o transformante T-41.

A análise do cromatograma mostrou não haver diferença entre as enzimas excretadas pelo receptor e a linhagem T-41, quanto à maneira de atuação sobre o amido. *B. natto* e os recombinantes F-52 e T-39 apresentaram o mesmo perfil de produção para a protease neutra e alcalina (Figura 5).

O início da síntese de protease se deu quando o crescimento microbiano alcançou a fase exponencial. A atividade proteolítica máxima foi observada na fase estacionária.

Conclusões

O melhoramento genético por transformação mostrou ser mais eficiente na obtenção de recombinantes do que a fusão de protoplastos.

Os transformantes T-39 e T-41 produziram, respectivamente, mais proteases e mais alfa-amilase e proteases do que o receptor *B. amyloliquefaciens*.

Figura 3 - Efeito da temperatura na atividade da α -amilase

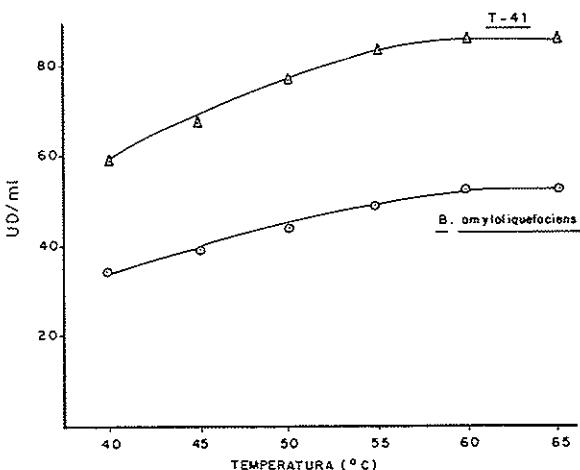


Figura 4 - Efeito da temperatura na estabilidade da α -amilase

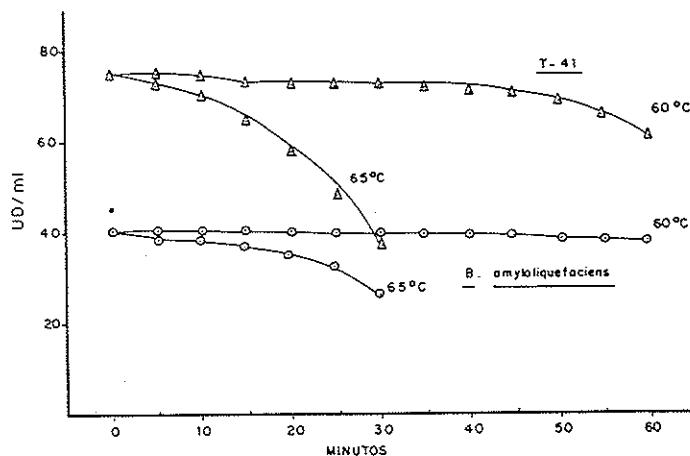
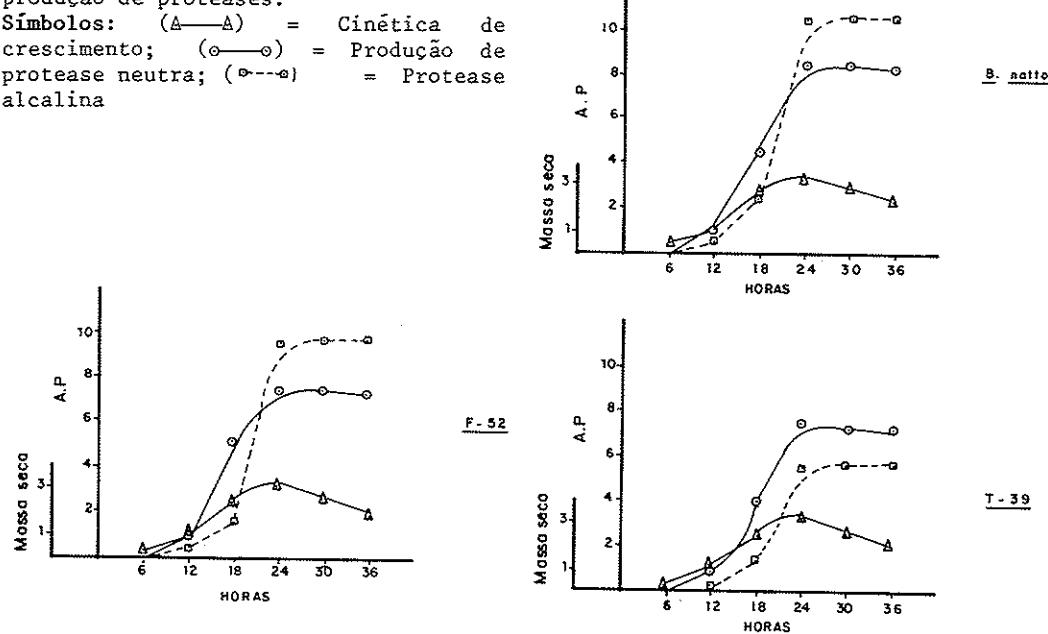


Figura 5 - Cinética de crescimento e produção de proteases.

Símbolos: (Δ — Δ) = Cinética de crescimento; (\circ — \circ) = Produção de protease neutra; (\square — \square) = Protease alcalina



A linhagem F-52, obtida por fusão, produziu duas vezes mais alfa-amilase do que a parental *B. natto*.

A alfa-amilase do transformante T-41 mostrou-se menos termoestável do que a do receptor.

A análise do cromatograma evidenciou que as enzimas produzidas pelo receptor e pelo T-41 apresentaram a mesma maneira de atuação sobre o amido.

Referências Bibliográficas

1. Anson, M.L. - The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. *J. Gen. Physiol.*, 20:565-574, 1937.
2. Fogarty, W.M.; Griffin, P.J. & Joyce, A.M. - Enzymes of *Bacillus* species. *Process Biochem.*, 9:11-24, 1974.
3. Haas, M. & Yoshikawa, H. - Defective bacteriophage PBSK in *Bacillus subtilis*. II - Intracellular development of the induced prophage. *J. Virol.*, 3:248-260, 1969.
4. Krishnan, T. & Chandra, A.K. - Effect of oilseed cakes on α -amylase production by *Bacillus licheniformis* CUMC 305. *Appl. Environm. Microbiol.*, 44:270-274, 1982.
5. Leighton, T.J.; Doi, R.H.; Warren, R.A.J. & Kelln, R.A. - The relationship of serine protease activity to RNA polymerase modification and sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.*, 76:103-122, 1973.
6. Medda, S. & Chandra, A.K. - New strains of *Bacillus licheniformis* and *Bacillus coagulans* producing thermostable α -amylase activity at alkaline pH. *J. Appl. Microbiol.*, 48:47-58, 1963.
7. Oishi, M.; Takahashi, H. & Maruo, B. - Intracellular α -amilase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 85:246-247, 1963.
8. Peberdy, J.F. - Isolation and fusion of bacterial protoplasts. In: - A handbook of experimental methods. University of Nottingham, c.1, p.1-4, 1979.

9. Pebernry, J.F. - Protoplast fusion: a tool for genetic manipulation and breeding in industrial microorganisms. *Enz. Microb. Technol.*, 2:23-29, 1980.
10. Saito, N. - A thermophilic extracellular α -amilase from *Bacillus licheniformis*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 155:290-298, 1973.
11. Saito, H. & Miura, K.I. - Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochem. Biophys. Acta*, 72:619-629, 1963.
12. Sasaki, T.; Yamasaki, M.; Maruo, B.; Yoneda, Y.; Yamane, K.; Takatsuki, A. & Tamura, G. - Hyperproductivity of extracellular α -amilase by a tunicamycin resistant mutant of *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 70:125-131, 1976.
13. Trevelyan, W.E.; Procter, D.P. & Harrison, J.G. - Detection of sugar on paper chromatograms. *Nature*, 166:444-445, 1950.
14. Uehara, H.; Yoneda, Y.; Yamane, K. & Maruo, B. - Regulation of neutral protease productivity in *Bacillus subtilis*: transformation of high protease productivity. *J. Bacteriol.*, 119:82-91, 1974.
15. Vidoli, R.; Yamazaki, A. & Veliky, I.A. - A novel procedure for the recovery of hybrid products from protoplast fusion. *Biotechnol. Lett.*, 12:781-784, 1982.
16. Yamaguchi, K.; Nagata, Y. & Maruo, B. - Isolation of mutants defective in a α -amilase from *Bacillus subtilis* and their genetic analysis. *J. Bacteriol.*, 119:416-424, 1974.
17. Yoneda, Y. - Increased production of extracellular enzymes by the synergistic effect of genes introduced into *Bacillus subtilis* by stepwise transformation. *Appl. Env. Microbiol.*, 39:274-276, 1980.
18. Yoneda, Y. & Maruo, B. - Mutation of *Bacillus subtilis* causing hyperproduction of α -amylase and protease and its synergistic effect. *J. Bacteriol.*, 120:48-54, 1975.
19. Yoneda, Y.; Yamane, K. & Yamaguchi, Y. - Transformation of *Bacillus subtilis* in α -amilase productivity by DNA from *Bacillus subtilis* var. *amylosaccharoliticus*. *J. Bacteriol.*, 120:1144-1150, 1974.
20. Yoshikawa, H. - Temperature-sensitive mutants of *Bacillus subtilis*. I - Multiforked replication and sequential transfer of DNA by a temperature-sensitive mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 65:206-213, 1970.

APARELHO SIMPLIFICADO PARA DETERMINAÇÃO DE CARBONO POR COMBUSTÃO SECA*

Augusto Ferreira da Eira
Marli Teixeira de Almeida Minhoní

Deptº de Defesa Fitossanitária
Área de Biotecnologia Agrícola FCA/UNESP
Caixa Postal 237
18600 Botucatu SP, Brasil

& Sérgio Luiz Monteiro Salles Filho

Núcleo de Política Científica e Tecnológica
Instituto de Geociências UNICAMP
Caixa Postal 6152
13100 Campinas SP, Brasil

Resumo

Descreve-se aparelho para determinação de carbono orgânico por combustão seca (805°C), em forno tubular de porcelana, sob fluxo constante de O_2 e absorção do CO_2 em NaOH , com subsequente análise por titulometria. Revelou-se rápido (8 min/análise), de baixo custo e preciso, correlacionando-se de forma altamente significativa com DQO, sólidos totais voláteis, dissolvidos e em suspensão. Por sua sensibilidade, pode ser utilizado na operação e controle de reatores biológicos de pequeno porte.

Summary

Simplified apparatus to quantitative organic carbon determinations by dry combustion

Apparatus to organic carbon determination by dry combustion (805°C) in porcelain tubular oven, by constant flow of O_2 and CO_2 absorption in NaOH , with subsequent titulometric analysis is described. It was a rapid method (8 min/analyses), not expensive and precise, highly significative correlationated with COD and total volatile solids, dissolved or in suspension. By its sensibility, it may be utilized in operation and control of little capacity biological reactors.

Os métodos tradicionais de combustão seca, embora em uso há muitas décadas, tenderam a ser substituídos pela combustão úmida, principalmente em função do custo de equipamento (Allison, L.E., Soil Sci. Soc. Am. Proc., 24:36-40, 1960; Kaminsky, R., Soil Sci., 130:118-123, 1980; Mebius, L.J., Anal. Chim. Acta, 22:120-124, 1960; Quaggio, J.A. & col., R. bras. Ci. Solo, 3:184-187, 1979).

Entretanto, o aparelho ora descrito, com temperatura de combustão a 805°C , inferior às normalmente utilizadas em equipamentos comerciais sofisticados (1.000 a 1.600°C), reduz substancialmente o custo sem, contudo, prejudicar a precisão analítica (Tabela 1). Outrossim, a simplicidade do aparato, a rapidez do método e a

*Parte da Tese de Mestrado do último autor; FCA-UNESP, Campus de Botucatu, SP, abril de 1986.

Tabela 1 - Determinação de carbono orgânico por combustão seca em amostras padrão de β -D(-) Frutose p.a., através do aparelho proposto.

Símbolos: * = Médias de 5 repetições; $s(\bar{m})$ = Desvio padrão da média

mg C Teórico	mg C Observado	$s(\bar{m})$
0,3997	0,3888(*) \pm 0,0488	
0,7995	0,7632 \pm 0,0367	
1,1993	1,1520 \pm 0,1138	
1,5991	1,4832 \pm 0,0982	
1,9989	1,8303 \pm 0,0132	
3,9978	3,7797 \pm 0,0132	
5,9967	5,2730 \pm 0,0198	
7,9955	6,5549 \pm 0,0324	
9,9944	7,2553 \pm 0,0132	
11,9933	8,0615 \pm 0,0362	
13,9922	8,7222 \pm 0,0443	
15,9911	9,8192 \pm 0,0742	

utilização de pequenas amostras, em que pese sua menor representatividade analítica, possibilitam a operação e controle de reatores biológicos de pequeno porte. Através de análises de regressão linear, pode substituir determinações demoradas e/ou expensivas tais como DQO, sólidos, concentração celular e outras.

Conforme apresentado nas Figuras 1 e 2, trata-se de uma modificação do equipamento descrito por Allison, L.E.

& col. (In: - Black, C.A. & col., Am. Soc. Agron. Inc., 1965).

O diagrama eletro-eletrônico da Figura 2, pode ser viabilizado por técnicos em eletrônica de qualquer cidade, face à sua simplicidade e à facilidade de obtenção dos componentes. Para calibrar o termostato (alterando a posição do "trim-pot", Fig. 2), pode-se utilizar milivoltímetro entre os terminais S+ e S- ou, então, utilizar o NaCl como indicador, já que sua fusão ocorre a 801°C.

A amostra é colocada em navetas de porcelana e introduzida no forno tubular a 805°C (tubo de porcelana não porosa, medindo 60cm x 2,5cm de diâmetro externo, conforme à Figura 1), para combustão durante 6 minutos, sob fluxo constante de O₂ livre de CO₂ (300ml/min.). Para o uso de amostras líquidas (1 a 2ml, envolvendo ou não diluição da amostra original) as navetas devem ser revestidas internamente com papel alumínio, havendo também necessidade de secagem a 100-105°C, antes da combustão.

Na parte terminal do forno tubular o CuO, à temperatura de aproximadamente 250°C, catalisa a oxidação do CO a CO₂, diminuindo os problemas de combustão incompleta. O CO₂ da combustão é arrastado pelo fluxo de gás e absorvido em 10ml de NaOH-0,25N. Em seguida, precipita-se os carbonatos formados com 5ml de solução saturada de BaCl₂. A soda livre remanescente é titulada com HCl-0,1N, utilizando-se

Figura 1 - Aparato simplificado para determinação do carbono volátil por combustão seca a 805°C: A - Diagrama esquemático e B - Protótipo do equipamento.

Símbolos: l = Lâ de vidro; c = Caixa com tijolos refratários; n = Naveta de porcelana; o = CuO envolto por duas telas de cobre; p = Funil com pérolas de vidro (2mm φ) e NaOH; f = Junção fria do par termoelectrônico; q = Junção quente do par termoelectrônico; h = Haste para introdução e retirada da naveta; t = Tubo de porcelana não porosa

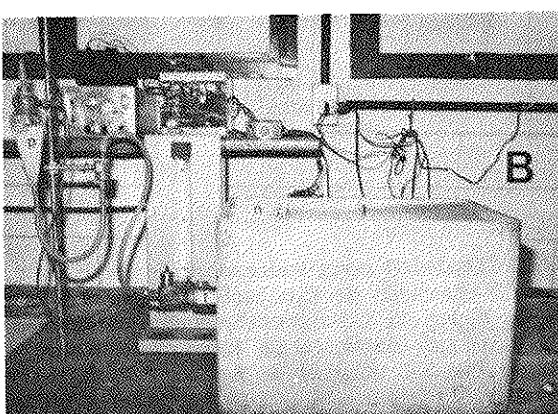
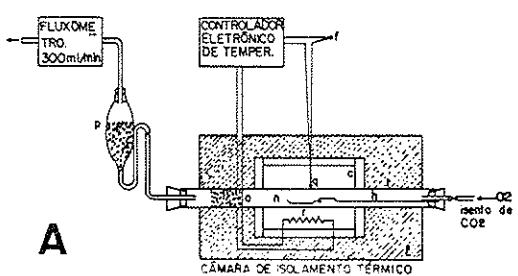
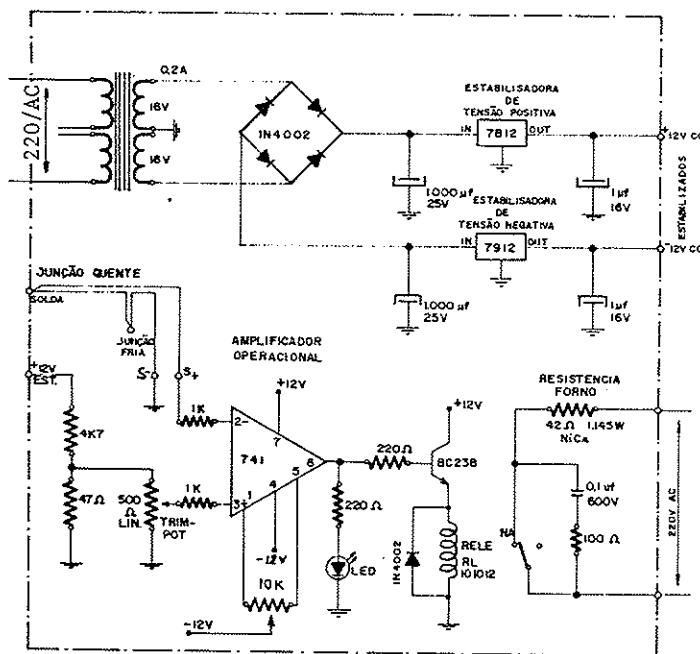


Figura 2 - Diagrama eletrônico do termostato de precisão utilizando par termo-elétrico de ferro/constantâ como sensor de temperatura



fenolftaleína como indicador. O tempo de cada análise não excede 8 minutos, desde que a operação de titulação seja efetuada durante a queima da amostra seguinte.

Os dados da titulometria são aplicados à equação abaixo obtendo-se, desta forma, o carbono orgânico da amostra oxidada a CO₂ (mgC) e, por cálculo estequiométrico, obtém-se o C volátil em mg C/l ou kg da amostra.

mgC = (V_b - V_a) . N HCl . 6 (1), onde: V_b = volume de HCl, em ml, gasto na titulação da prova em branco; V_a = volume de HCl, em ml, gasto na titulação da amostra; N HCl = normalidade do HCl.

Os valores observados na expressão (1), necessitam correções em função das características construtivas de cada aparelho e faixa de carbono em análise. Obtém-se pela queima de amostras padrão de frutose p.a. ou outro açúcar e, destina-se a corrigir erros oriundos da combustão incompleta (tempo de aquecimento da amostra), falha no arraste, absorção, etc.

Análises de regressão dos dados originais da Tabela 1, revelaram que a correção dos valores observados segue, de forma altamente significativa ($r^2 = 0,9961$), uma equação do 2º grau: $Y = 0,459 + 0,471X + 0,116 X^2$ (2), onde: Y = mg C corrigido; X = mg C observado na expressão (1).

O método foi aplicado em ensaios envolvendo o tratamento biológico anaeróbico de efluentes agroindustriais. As equações de regressão linear entre C volátil x DQO e C volátil x sólidos totais (permitindo correlações com sólidos dissolvidos e sólidos em suspensão, mediante o processamento preliminar das amostras), apresentaram coeficientes de regressão altamente significativos, como se segue:

$Y = 1866,1912 + 2,2564 X$ ($r = 0,9862^{**}$), onde: Y = DQO, em mg O₂/l; X = Carbono volátil, em mg C/l; $Y' = 0,39278 + 1,46866 X'$ ($r = 0,9655^{**}$), onde: Y' = Sólidos totais, em g/l; X' = Carbono volátil, em mg/l.

MODIFICAÇÃO DA TÉCNICA "ROLL-TUBE" COM MEIOS DE CULTURA PRÉ-REDUZIDOS PARA ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS ANAERÓBIOS ESTRITOS

Manoel Armando Azevedo dos Santos
 & Eduardo do Nascimento Mós

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

Nos últimos anos, tem sido bastante difundida a utilização dos meios pré-reduzidos (PRAS = Pre Reduced Anaerobe System) no isolamento de anaeróbios estritos, mesmo aqueles mais exigentes em relação ao potencial de oxi-redução, como decorrência dos cursos ministrados pelo Virginia Polytechnic Institute Anaerobe Laboratory (Blacksburg, Virginia, USA) e da divulgação do manual de laboratório (1).

Hungate (2) introduziu a metodologia inovadora, mas Moore (3) sugeriu as adaptações que facilitaram sua utilização no isolamento de microrganismos exigentes de condições respiratórias específicas. Os meios de cultura são preparados na ausência de oxigênio, acondicionados em tubos próprios, lacrados com tampas de borracha; desse modo, os tubos constituem sistemas individuais de anaerobiose, exigindo condições de manipulação livres de oxigênio para a inoculação ou transferências de cultivos de bactérias anaeróbias. Holdeman & Moore (1) adaptaram a tecnologia para possibilitar a preparação de meios sólidos, visando a obtenção de superfície lisa para receber semeadura por estriadas com a finalidade de facilitar o isolamento de colônias. Esta superfície é preparada com auxílio de equipamento próprio que favorece a solidificação do meio nas paredes do tubo de ensaio de maneira uniforme, contando ainda com o emprego de tubos de ensaio reforçados e de maior calibre, peça giratória acoplada à fonte de CO₂ (para inoculação) e prensas para autoclavação.

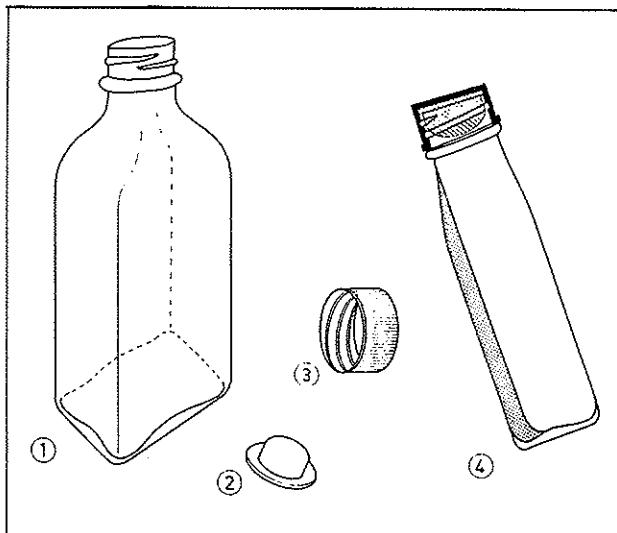
No Brasil, poucos são os laboratórios que utilizam meios pré-reduzidos em sua rotina de isolamento ou no desenvolvimento de projetos de pesquisa, talvez desestimulados pela necessidade de empregar equipamentos especializados, inclusive para preparar os meios de cultivo.

No presente trabalho, propomos uma modificação da técnica "roll tube", com a preocupação de manter a sensibilidade da técnica original, e dispensando-se a utilização do equipamento sofisticado para elaboração do meio sólido conforme foi mencionado anteriormente.

A modificação consiste na substituição do tubo de ensaio reforçado e especial, por frasco do tipo xarope, com a capacidade de 150ml, dotado de rolha de borracha e tampa rosqueável (Figura 1). Depois da distribuição do meio pré-reduzido neste frasco, também sob o fluxo de CO₂, este é esterilizado, resfriado para eventual adição de enriquecedores e colocado na posição horizontal, no lado de sua maior área, até completa solidificação do ágar (Figura 1). Esta modificação permite a observação da superfície colonial ao microscópio estereoscópico, como também o emprego do ágar sangue como meio nutritivo para isolamento dos microrganismos anaeróbios.

Para constatar que a modificação agora proposta mantém a sensibilidade do método do "roll tube", foram realizados testes microbiológicos com microrganismos anaeróbios pertencentes à coleção do ICB/USP (*Veillonella* sp., *Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Clostridium difficile* e *Peptococcus* sp.) e isolados recentemente de placa dental subgengival (*B. melaninogenicus*, *Bacteroides gengivalis*, *Veillonella* sp., *Fusobacterium nucleatum*; *Bifidobacterium bifidum* e *Propionibacterium* sp.).

Figura 1 - 1 = Frasco de vidro tipo xarope (150ml); 2 = Tampa de borracha; 3 = Tampa rosqueada; 4 = Frasco com meio de cultura (10ml)



A manutenção da sensibilidade do método ora proposto, para cultivo de bactérias anaeróbias estritas, sua simplicidade e a possibilidade de visualização da morfologia colonial em ágar sangue, justificam o uso rotineiro dessa metodologia no diagnóstico laboratorial de infecções causadas por bactérias anaeróbias.

Referências Bibliográficas

1. Holdeman, L.V. & Moore, W.E.C. - Anaerobe laboratory manual. 3.ed. Virginia, USA, VPI Anaerobe, 1975.
2. Hungate, R.E. - The rumen and it's microbes. New York, Academic Press, 1966.
3. Moore, W.E.C. - Techniques for routine culture of fastidious anaerobes. Int. J. Syst. Bacteriol., 16:173-190, 1966.

REDUÇÃO DA ABSORÇÃO DE OXIGÊNIO POR KLEBSIELLA spp. SOB AÇÃO DE ANTIMICROBIANOS

Evanil Pires de Campos

Deptº de Moléstias Infecciosas e Parasitárias,
Dermatologia e Radiologia
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP
Campus de Botucatu
18600 Botucatu SP, Brasil

Oswaldo Galvão Brasil

Deptº de Bioquímica
Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola/UNESP
Campus de Botucatu

& Claudia Esteves Oliveira Pires de Campos

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola/UNESP

Resumo

Foram isoladas *Klebsiella* spp. da secreção catarral purulenta de doentes internados com pneumonia. Após o isolamento e a identificação das bactérias determinou-se o nível de resistência a antibióticos pelo método da diluição em placas de 15 amostras de *Klebsiella* spp. ensaiadas. O consumo de oxigênio bacteriano foi determinado pelo eletrodo polarimétrico de Clark. O cianeto de potássio (KCN) e os inibidores clássicos da respiração foram utilizados no final de cada curva de consumo de oxigênio bacteriano registrado. As drogas bactericidas modificaram o comportamento respiratório de 50% das amostras sensíveis e determinaram evidente redução de consumo de oxigênio nas *Klebsiella* spp. resistentes. Os resultados permitiram concluir que os antibióticos avaliados agem sobre o sistema respiratório além de seus mecanismos principais de ação sobre a parede celular e síntese proteica.

Summary

Oxygen uptake in Clark's polarography of Klebsiella spp.-isolated from pulmonary infections

Oxygen uptake was reduced in 50% of *Klebsiella* spp. sensitive to several antimicrobial agents. Measurements were made on cultured strains with the use of Clark's electrode. Bactericide drugs used were more effective than bacteriostatic agents. The agents did not act on the conventional respiratory mechanism of bacteria.

Introdução

A respiração aeróbia de bactérias está aberta à investigação científica, principalmente, no que se refere à ação de inibidores eletivos do sistema respiratório (4, 5, 8, 10). Em trabalho anterior, os autores demonstraram que

bactérias multirresistentes a drogas são capazes de utilizar uma via respiratória alternada, quando submetidas ao estudo polarigráfico de Clark (4, 8, 10). Sugeriram, para o fato observado, que os antimicrobianos usados em infecções pulmonares induziriam o aparecimento de uma via respiratória alternada e/ou à seleção de mutantes resistentes pré-existentes capazes de utilizar essa via resistente ao cianeto de potássio (KCN) (4, 8, 10).

Resolveu-se, portanto, avaliar o comportamento respiratório de *Klebsiella spp.* sensíveis e resistentes isoladas de infecções pulmonares humanas diante da ação de antibióticos bactericidas e bacteriostáticos mais utilizados em clínica.

Material e Métodos

Origem das amostras - Estudaram-se 15 amostras de *Klebsiella spp.* (7) isoladas da secreção broncopulmonar de pacientes com pneumonias agudas internados na Enfermaria de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo.

Concentração inibitória mínima (CIM) - As concentrações inibitórias mínimas (CIM) das amostras ensaiadas foram:

Cefalosporinas - T33 (3^a) >1000mcg/ml; T18 (1^a) = 128mcg/ml; T1 (1^a) = 4mcg/ml; T55 (1^a) = 1,0mcg/ml.

Ampicilina - T33 (3^a) = 128mcg/ml; T18 (1^a) >1000mcg/ml; T36 (1^a) = 256mcg/ml; T43 (3^a) = 1000mcg/ml; T3 (1^a) = 64mcg/ml; T31 (1^a) = 16mcg/ml.

Kanamicina - T43 (3^a) = 256mcg/ml; T18 (1^a) = 128mcg/ml; T33 (3^a) = 0,1mcg/ml; T8 (2^a) = 0,05mcg/ml.

Gentamicina - T27 (2^a) = 0,2mcg/ml; T18 (1^a) = 0,8mcg/ml; T10 (1^a) <0,025mcg/ml; T46 (1^a) <0,025mcg/ml.

Cloranfenicol - T46 (2^a) = 32mcg/ml; T18 (1^a) = 120mcg/ml; T27 (2^a) = 0,05mcg/ml; T36 (1^a) = 0,4mcg/ml.

Tetraciclina - TGO = 128mcg/ml; T18 (1^a) = 256mcg/ml; T3 (1^a) = 0,8mcg/ml; T36 (1^a) = 0,4mcg/ml.

Eritromicina - T31 (1^a) = 500mcg/ml; T18 (1^a) = 64mcg/ml; T3 (1^a) = 128mcg/ml; T43 (1^a) = 8mcg/ml.

Trimetoprim - T18 (1^a) >1000mcg/ml; T3 (1^a) = 128mcg/ml; T1 (1^a) = 8mcg/ml; T8 (2^a) = 4mcg/ml.

A metodologia aplicada na determinação da C.I.M. encontra-se descrita em trabalho anteriormente publicado (3).

O critério para caracterização de bactérias sensíveis e resistentes foi estabelecido por uma curva bimodal (2, 3, 4, 13).

Respiração bacteriana - O critério de escolha das bactérias para o presente estudo, foi baseado principalmente no modelo de resistência desses agentes frente aos antimicrobianos bactericidas e bacteriostáticos mais utilizados em clínica (3). A escolha da amostra bacteriana foi baseada também na sensibilidade ou na resistência aos diversos antimicrobianos estudados (3, 13).

Selecionaram-se para cada um dos 8 (oito) antimicrobianos, 4 (quatro) amostras de *Klebsiella spp.*, sendo que as bactérias escolhidas eram sempre sensíveis ou resistentes aos fármacos ensaiados.

Polarografia de Clark - Para o estudo da respiração bacteriana utilizou-se cultura das amostras em torno de 18 horas de crescimento na concentração de 6×10^{-8} unidades formadoras de colônias por ml. O consumo de oxigênio foi medido com o auxílio de um oxígrafo de volume e temperatura padronizados, ao qual se ligou um eletrodo tipo Clark (9).

Os dados foram determinados por um registrador modelo 291/MM da Varian S/A acoplado ao sistema.

Os efeitos dos inibidores da respiração bacteriana foram avaliados pelo uso de 0,2ml da amostra em 1,8ml de Brain Heart Infusion (B.H.I.) - Oxoid, adicionados à cubeta de 2ml. Diferentes concentrações de KCN (cianeto de potássio), SHAM (ácido

salicilhidroxâmico), antimicina A e rotenona, em volume de 10 μ l foram adicionados à cubeta para o estudo proposto.

Utilizou-se o cianeto de potássio, no final de cada curva registrada a fim de se confirmar e de avaliar o comportamento respiratório bacteriano. A dose de KCN não tóxica a célula bacteriana acha-se padronizada para o estudo da cadeia respiratória.

Drogas utilizadas e sua procedência - Utilizaram-se os seguintes antimicrobianos bactericidas e bacteriostáticos: Cf = Cefalotina - Eli Lilly and Company, Indianápolis, U.S.A.; T = Tetraciclina - Laborterápica Bristol S/A; Amp = Ampicilina - Laborterápica Bristol S/A; K = Kanamicina - Laborterápica Bristol S/A; G = Gentamicina - Schering Corporation U.S.A.; Tr = Trimetoprim - Produtos Roche Químicos e Farmacêuticos S/A; Cl = Cloranfenicol - Laboratório Carlo Erba; Er = Eritramicina - Laboratório Upjohn Produtos Farmacêuticos. As soluções de antibióticos foram, sempre, preparadas momentos antes de serem utilizadas.

Resultados

Klebsiella spp. sensíveis às drogas bactericidas - *Klebsiella spp.* T31 e T3 apresentaram, nas concentrações de 50 e 0,5mcg da ampicilina, redução da respiração de 5,60 a 5 μ mol2/min. e de 4,96 a 3,10 μ mol2. A 0,5mcg/ml do antibiótico, apenas a T3 reduziu sua respiração à metade do valor inicial (Figura 1).

Klebsiella spp. T1 e T55 apresentaram diminuição da respiração de 9,92 a 7,44 μmol O₂ e de 8 a 2,4 μmol O₂ nas concentrações de 0,05 a 500 mcg/ml de cefalotina, respectivamente, a partir do endógeno (E) (Figura 1).

Em relação à concentração de 0,05 a 500mcg/ml de kanamicina, *Klebsiella* spp. T33 não modificou a sua respiração e a T8 sofreu uma queda respiratória de 14,88 para 13,64 μ molO₂ (Figura 1).

Klebsiella spp. T10 e T46 sensíveis à gentamicina deixaram de respirar às

Figura 1 - Ação de antimicrobianos bactericidas sobre o consumo de oxigénio de bactérias sensíveis.

Símbolos: * = Endógeno

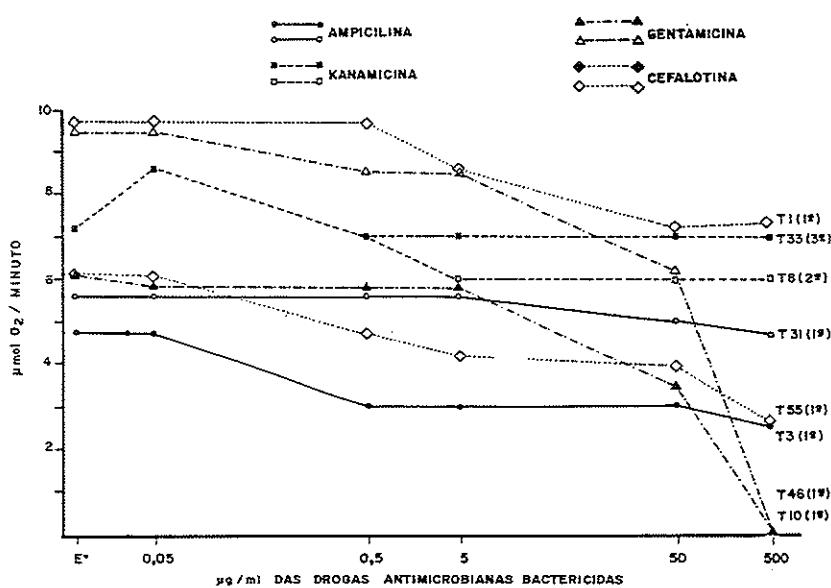


Figura 2 – Ação de antimicrobiano bacteriostáticos sobre o consumo de oxigênio de bactérias sensíveis.

Símbolos: * = Endógeno

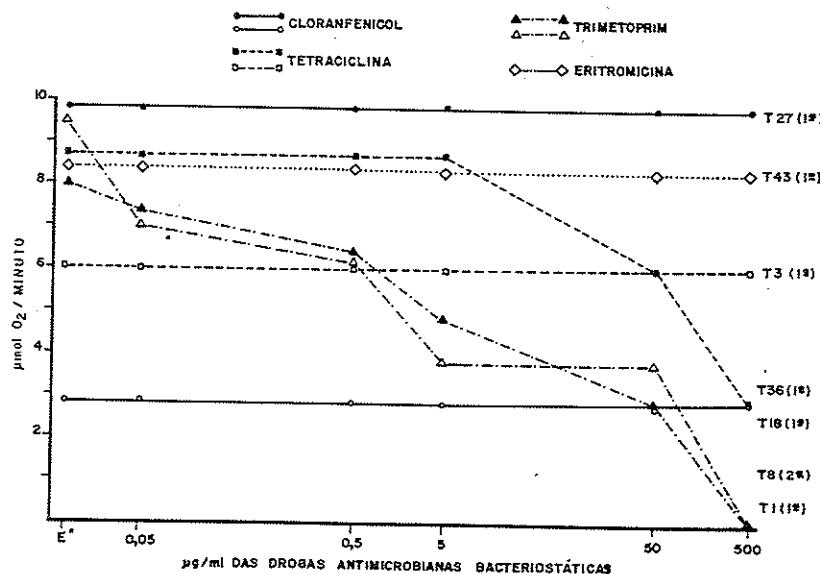
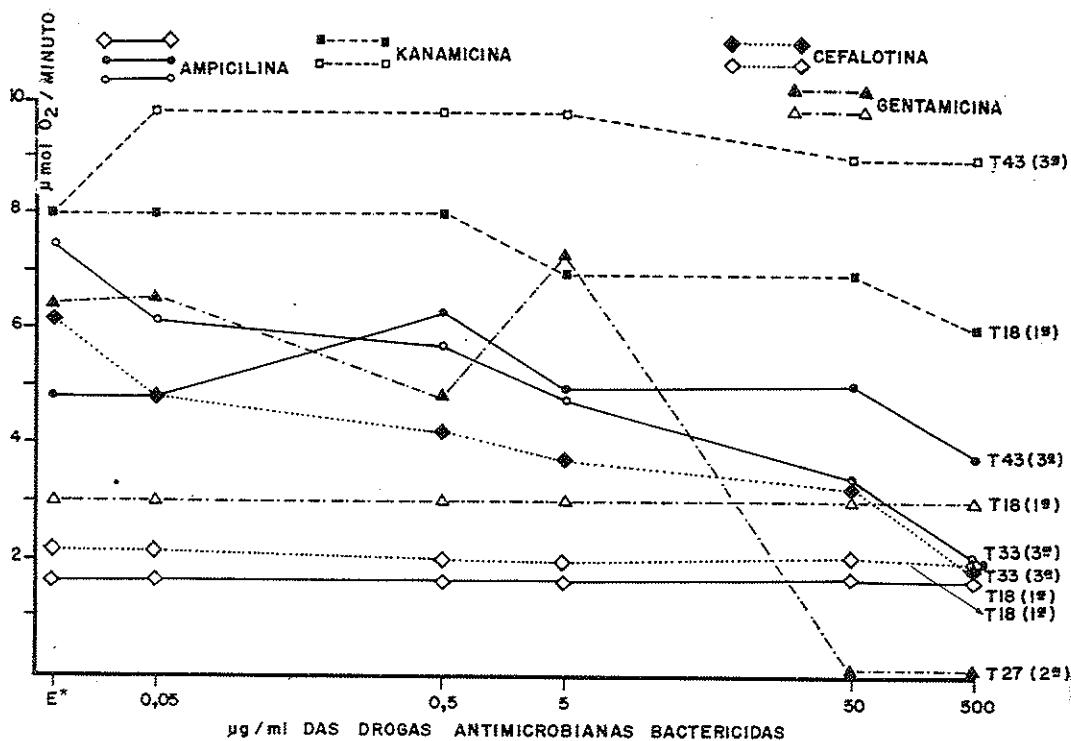


Figura 3 – Ação de antimicrobianos bactericidas sobre o consumo de oxigênio de bactérias resistentes.

Símbolos: * = Endógeno



concentrações de 500mcg/ml após decréscimo rápido da respiração de 5 para 50mcg/ml do antibiótico (Figura 1).

Klebsiella spp. sensíveis aos antimicrobianos bacteriostáticos - *Klebsiella spp.* T27 e T36 não modificaram sua respiração frente as concentrações crescentes de 0,05 a 500mcg/ml do cloranfenicol (Figura 2).

Klebsiella spp. T3 não modificou sua respiração frente as concentrações crescentes de 0,05 a 500mcg/ml de tetraciclina. A T36 apresentou uma diminuição da respiração de 8,68 para 6,20 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ a 50mcg/ml de tetraciclina e deixou de respirar a concentração de 500mcg/ml do antibiótico (Figura 2).

Klebsiella spp. T43 não modificou sua respiração frente as concentrações crescentes de 0,05 a 500mcg/ml da eritromicina (Figura 2).

Klebsiella spp. T1 e T8 sofreram diminuição progressiva respiratória frente as concentrações crescentes do trimetoprim, deixando de respirar a 500mcg/ml do fármaco (Figura 2).

Klebsiella spp. resistentes a bactericidas - *Klebsiella spp.* T18 não modificou a respiração de 2,06 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ nas concentrações de 0,05 a 500mcg/ml de cefalotina. A T33 diminuiu de 6,08 para 1,86 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ com aumento da concentração de 0,05 a 500mcg/ml de cefalotina (Figura 3).

A T18 não alterou sua respiração de 1,65 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ por minuto nas concentrações de 0,05 a 500mcg/ml de ampicilina. A T33 apresentou queda progressiva da respiração de 7,44 a 2,85 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ nas concentrações de 0,05 a 500mcg/ml de cefalotina.

A T43 apresentou diminuição da respiração de 4,96 para 3,76 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ a partir de 50mcg/ml da ampicilina (Figura 3).

A T18 apresentou discreta diminuição da respiração nas concentrações de 0,5 a 5mcg/ml e acentuada queda de 50 a 500mcg/ml de kanamicina. A T43 inicialmente mostrou aumento da respiração de 8,68 para 11,16 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ nas concentrações de 0,05 a 5mcg/ml e queda relativa de 11,16 a 9,92 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ de 5 a 50mcg/ml de kanamicina (Figura 3).

A T18 manteve sua respiração em torno de 2,86 $\mu\text{mol}/\text{O}_2/\text{min}$. quando submetida a concentração de 0,05 a 500mcg/ml de gentamicina. A T27 deixou de respirar a concentração de 50mcg/ml de gentamicina após aumento respiratório de 5 para 7,55 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ (Figura 3).

Estudo das Klebsiella spp. resistentes frente aos antimicrobia nos bacteriostáticos - O cloranfenicol nas concentrações de 0,05 a 500mcg/ml, não alterou a respiração de 0,65 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ da T18, porém foi capaz de aumentar a respiração de 9,92 para 11,16 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ da T46 (Figura 4).

A T18 deixou de respirar de 4,96 para 0 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ frente as concentrações crescentes de 0,05 a 500mcg/ml de tetraciclina. A bactéria denominada TGO deixou de respirar de 6,20 para 0 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ diante de 0,05 a 500mcg/ml de tetraciclina (Figura 4).

A eritromicina não foi capaz de alterar a respiração das amostras T3, T18, T31 de 7, 10,7 e 16,12 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ respectivamente nas diferentes concentrações estudadas (Figura 4).

O trimetoprim não foi capaz de alterar a respiração de 4,96 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ da amostra T18. A T3 sofreu sob a ação das diferentes concentrações do trimetoprim uma diminuição inicial de 6,2 para 3,72 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ seguida de uma elevação de 3,72 para 4,96 $\mu\text{mol}/\text{O}_2$ e posteriormente, deixou de respirar (Figura 4).

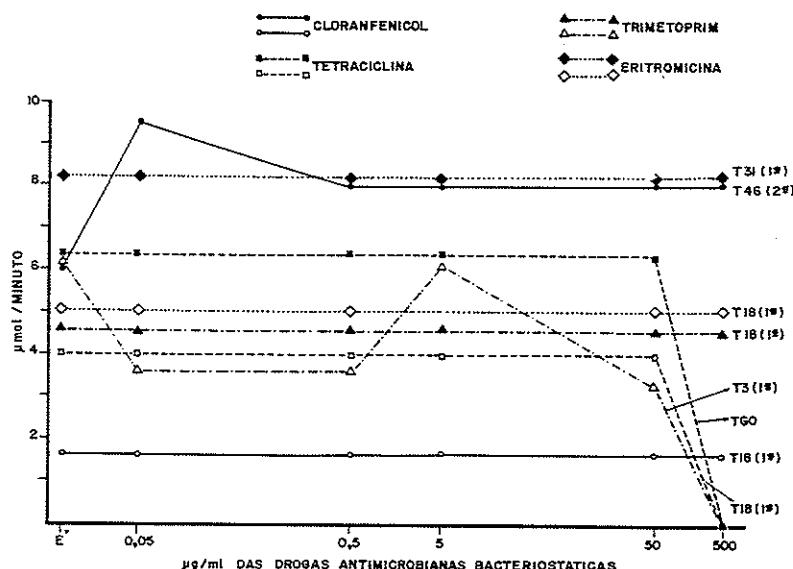
As *Klebsiella spp.* T18 e T43 mostraram-se insensíveis à ação do cianeto de potássio (KCN) colocado durante o estudo do consumo de oxigênio bacteriano pela polarografia de Clark.

Discussão

Na cadeia respiratória os sistemas citocromo c e a são bloqueados pelo cianeto de potássio (KCN), monóxido de carbono (CO) e azida (4, 5, 8, 10). No presente trabalho o KCN foi utilizado sempre com a finalidade de se confirmar a atividade respiratória das bactérias.

Figura 4 - Ação de antimicrobianos bacteriostáticos sobre o consumo de oxigênio de bactérias resistentes.

Símbolos: * = Endógeno



As amostras de *Klebsiella spp.* sensíveis quando submetidas a ação de bactericidas ensaiados evidenciaram diminuição do consumo de oxigênio em mais de 50% delas. Apenas a T33 não teve seu comportamento respiratório modificado frente as concentrações crescentes de kanamicina. Este fato observado com a T33 pareceu-nos de difícil explicação, pois o aminoglicosídeo ensaiado age diretamente na síntese protéica e não na via respiratória das bactérias. Nossos resultados porém, mostraram uma ação antibiótica sobre a via respiratória das amostras avaliadas.

Klebsiella spp. sensíveis não modificaram seu comportamento respiratório quando submetidas à ação dos bacteriostáticos ensaiados. Apenas três amostras sofreram modificação da respiração a partir de altas concentrações dos antibióticos empregados. Os resultados obtidos sugerem que as drogas bactericidas possuem ação mais efetiva no sistema respiratório que as drogas bacteriostáticas em amostras de *Klebsiella spp.* a elas, sensíveis.

Klebsiella spp. T18 resistente não modificou seu comportamento respiratório diante de seis antimicrobianos ensaiados. Apresentou diminuição da respiração em altas concentrações de kanamicina. A resistência bacteriana aos aminoglicosídeos ocorre de três maneiras, a saber: ribossomal, transporte ineficaz da membrana e modificação genética mediada por plasmídeo, as quais poderiam auxiliar na explicação dos achados sobre a ação dos antibióticos na via respiratória (1, 2, 11, 12).

O transporte ineficaz transmembrana, possivelmente, seria capaz de explicar o fato assinalado em relação aos aminociclitóis.

Klebsiella spp. resistentes não modificaram seu comportamento respiratório diante dos antimicrobianos bacteriostáticos empregados. Apenas a tetraciclina impediu o registro da atividade respiratória das amostras designadas T18 e TGO. As bactérias resistentes às tetraciclinas diminuem a entrada do antimicrobiano pela dificuldade de difusão e/ou transporte iônico alterado na superfície celular (6). Novamente é possível sugerir-se que as drogas bactericidas são mais eficazes que as bacteriostáticas utilizadas para estudo da inibição da respiração de *Klebsiella spp.* a elas resistentes.

Os nossos achados confirmaram os da literatura onde os mecanismos de resistência

aos antibióticos analisados estão relacionados com a parede celular e a síntese protéica e não com o sistema respiratório (1, 2, 4, 5, 6, 11, 12).

As drogas bactericidas betalactâmicas utilizadas, ao origem na parede celular, facilitariam a ação desses fármacos sobre a via respiratória bacteriana.

As amostras bacterianas multirresistentes, T18 e T43, insensíveis à ação do KCN possibilitaram demonstrar em outro estudo a presença de uma via respiratória alternada (4).

O presente estudo evidenciou que os bacteriostáticos e bactericidas ensaiados agiram sobre a via respiratória das bactérias sensíveis e resistentes avaliadas.

Os mecanismos sugeridos por Campos & col. (4), em 1983, para explicar a ação de antimicrobianos sobre bactérias multirresistentes parecem adequados e estão na dependência da utilização de uma via respiratória alternada.

A síntese de uma via metabólica resistente mediada ou não por plasmídeo também foi lembrada por Neu (12), em 1984.

A via respiratória alternada, induzida pela multirresistência das amostras T18 e T43, provavelmente, influenciou de alguma maneira mudanças na parede e/ou membrana dessas bactérias impedindo, portanto, a ação dos antimicrobianos ensaiados.

Os fatos descritos devem auxiliar na indicação dos antibióticos em infecções humanas oriundas de bactérias resistentes às diversas drogas utilizadas em clínica.

Referências Bibliográficas

1. Benveniste, R. & Davies, S. - Mechanisms of antibiotics resistance in bacteria. *Ann. Rev. Biochem.*, 42:471-506, 1973.
2. Braude, I.L. - Mechanisms of action of antimicrobial drugs. In: - *Medical microbiology and infectious diseases*. Philadelphia, W.B. Saunders, vol.II, Cap.20, p.234-246, 1981.
3. Campos, E.P.; Azevedo, J.L. & Campos, C.E.O.P. - Modelos de resistência de bactérias isoladas de infecções pulmonares agudas. *F. Med. (BR)*, 88:159-160, 1984.
4. Campos, E.P.; Brasil, O.G. & Campos, C.E.O.P. - Ação de antimicrobianos sobre o componente respiratório de bactérias. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 14:239-246, 1983.
5. Chance, B. & Williard, G.R. - The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv. Enzymol.*, 135:65-113, 1956.
6. Chopra, I. & Bale, P.R. - Transport of antibiotics into bacteria. *Adv. Microb. Physiol.*, 23:183-240, 1983.
7. Edwards, D.L. & Ewing, N.H. - Identification of Enterobacteriaceae. Minneapolis, Burgess, 1972.
8. Edwards, D.L.; Rosenberg, E. & Maroney, P.A. - Induction cyanide insensitive respiration in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, 249:3551-3556, 1974.
9. Estabrook, R.W. - Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of A.D.P.: oratios. In: - Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. - *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, vol.10, p.41, 1967.
10. Lambowitz, A.M.; Smith, E.W. & Slayman, C.W. - Electron transport in *Neurospora* mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 247:4850-4858, 1972.
11. Lietman, P.S. - Aminoglycosides and spectinomycin: aminocyclitols. In: - Mandell, G.L.; Douglas Jr., G.R. & Bennet, J.E. - *Principles and practice of infectious diseases*. 2.ed. New York, John Wiley cap. 20, p.192-206, 1985.
12. Neu, H.C. - Changing mechanisms of bacterial resistance. In: - *Changing Patterns of Hospital Infections Symposium*. *Am. J. Med.*, 77:11-23, 1984.
13. Sommers, H.M. - Drug susceptibility testing in vitro: monitoring of antimicrobial therapy. In: - Youmans, G.P.; Paterson, P.Y. & Sommers, H.M. - *The biologic and clinical basis of infectious diseases*. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, cap.55, p.782-804, 1984.

PLASMID CURING OF *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA TYPHIMURIUM* BY TREATMENT WITH SODIUM DODECYL SULFATE AND HIGH TEMPERATURE INCUBATION*

Diana Mello Jungmann
& Luís Carlos de Souza Ferreira**

Deptº de Biofísica e Radiobiologia UFPE/CCB
Cidade Universitária
50000 Recife PE, Brasil

Summary

An unusual curing method based on growth in SDS medium and high temperature incubation was analysed in relation to elimination efficiency of the *F_{olac}* plasmid in *Escherichia coli* K12. No curing effect could be attributed to the incubation in medium with SDS. High frequency of plasmid elimination was observed after incubation of the strain in EC medium at 44.5°C. Both temperature and medium composition were important components for the final plasmid elimination. Application of the technique to *Salmonella typhimurium* plasmids showed no significant advantage in relation to conventional curing methods as treatment with ethidium bromide. The same results were obtained after conjugational transfer of *S. typhimurium* plasmids to *E. coli* cells.

Resumo

Cura de plasmídeos de Escherichia coli e Salmonella typhimurium pelo tratamento com sódio dodecil sulfato e incubação em temperatura elevada

A eficiência de um método de cura não convencional, baseado no crescimento de culturas em meio com SDS e subsequente incubação em temperatura elevada, foi analisada em relação a eliminação do plasmídeo *F_{olac}* em *Escherichia coli* K12. Nenhum efeito curagênico pode ser atribuído a incubação em meio com SDS. Frequências de cura elevadas foram observadas apenas após o tratamento da linhagem em meio EC a 44,5°C. Tanto a temperatura como a composição do meio foram fatores importantes para a eliminação final do plasmídeo. A aplicação da técnica em plasmídeos de *Salmonella typhimurium* não demonstrou vantagens significativas em relação a métodos de cura convencionais como a incubação em meio com brometo de etídeo. O mesmo resultado foi observado após a transferência por conjugação de plasmídeos de *S. typhimurium* para células de *E. coli*.

Introduction

Determination of bacterial traits coded by plasmids is a crucial step in the genetic and molecular analysis of bacterial pathogenicity (14). Plasmid curing

* Work supported by CNPq and FINEP grants.

**Corresponding author.

techniques are usually an useful approach to establish the extrachromosomal origin of such properties as resistance to antibiotics, production of toxins, invasiveness, serum resistance, adhesiveness and virulence factors (6, 8, 24).

Several methods have been described which interfere with plasmid replication leading to the production of plasmidless cells. Among these curing compounds or treatments are: novobiocin (18), spheroplast formation (13), thymine starvation of thymineless mutants (5), acriflavine (9, 16, 22), sodium dodecyl sulfate (20), incubation at high temperatures (11, 15), ethidium bromide (3), and several other mutagenic drugs (23). On the other hand, some enterobacterial genera or species are quite resistant to curing treatments and plasmidless strains are usually hard to isolate. In particular, *Salmonella typhimurium* strains are extremely insensitive to most, if not all, curing treatments available (19, unpublished observations).

An unusual procedure for plasmid elimination has been recently described (8). This technique is based in a *E. coli* enrichment process consisting of successive incubations in medium with SDS and high temperature. Recently, promising curing results have been obtained with plasmid-containing *S. agona* strains using this method (21).

In the present work we have analysed this new curing method in more detail. Different approaches were done to determine the effective step(s) of the original curing procedure. Some initial attempts were also made to apply this technique to pathogenic *S. typhimurium* antibiotic-resistant strains. (Abbreviations: SDS - sodium dodecyl sulfate; MD - Megadaltos; E.B. - ethidium bromide; Gm - gentamycin; Et - streptomycin; Km - kanamycin; Ap - ampicilin; Cm - chloramphenicol).

Materials and Methods

Bacterial strains - Bacterial strains used in this work are listed in Table 1. *S. typhimurium* strains 17 and 44 were recovered from faeces of hospitalized (diarrhoeic) children in Recife and kindly supplied by N.C. Leal from Aggeu Magalhães Research Institute.

Media and growth conditions - Unless otherwise stated cultures were grown in YT medium (g/l: tryptone, 10; yeast extract, 5; sodium chloride, 5) without agitation at 37°C during one night. Other media used were EC medium, lauryl tryptose broth and nutrient broth (Difco Laboratories), Muller-Hinton and McConkey agar (Merck). M9 medium was prepared as described by Miller (20). All media were adjusted to pH 7.2 before autoclaving. SDS (Sigma) and ethidium bromide (Merck) were analytical grade.

Plasmid DNA isolation - Plasmid DNA was isolated by the method of Kado & Liu (12). Electrophoresis was done at 100V for 2 hours in 0.7% agarose gels. Plasmids RP4 (32 MD) and Sa (23 MD) were used as molecular weight markers.

Plasmid curing - The procedure of Hill & Carlisle (8) was essentially followed. Briefly, 0.1ml of a liquid culture growth in YT during one night was used to inoculate 5ml of lauryl tryptose broth and incubated for 48 hours at 37°C (Step I). After incubation, 0.1ml of the culture was transferred to 5ml of EC broth and grown at 44.5°C for 48 hours (Step II). Cells were diluted in buffered saline and plated on MacConkey medium plates (for detection of lactose fermentation) or on YT medium plates (for detection of antibiotic resistance). Treatments of cultures with ethidium bromide (1mM) were done as described previously (3). Curing determination of antibiotic resistance markers was done by replica plating in YT agar plates containing one of the following antibiotics: ampicilin (50µg/ml), gentamycin (50µg/ml), kanamycin (50µg/ml), streptomycin (100µg/ml), chloramphenicol (25µg/ml).

Plasmid transfer - Conjugation experiments between *S. typhimurium* strains and *E. coli* J53 were done in liquid medium at 37°C without agitation during 2 or 24 hours.

Table 1 - Bacterial strains used in this work

Strain	Relevant phenotype	Reference or source
<i>E. coli</i> C600 (F_0 lac)	Lac ⁺ Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ Sm	21
<i>E. coli</i> C600 (Sa)	Lac ⁻ Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ Sm Km Su Cm Gm	23
<i>E. coli</i> C600 (RP4)	Lac ⁻ Thr ⁻ Leu ⁻ Thi ⁻ Sm Nm Km Ap Tc	23
<i>E. coli</i> J53	F ⁻ Rif Lac ⁺	22
<i>S. typhimurium</i> 44	Lac ⁻ Ap Km Sm Su Cm	clinical isolate
<i>S. typhimurium</i> 17	Lac ⁻ Ap Km Gm	clinical isolate

Table 2 - Effect of each sequential step of the SDS high temperature incubation curing procedure in F_0 lac elimination^a.

Symbols: a = Numbers represent the sum of at least three separate experiments; b = Step I - Growth in lauryl tryptose broth at 37°C for 48 hours; Step II = Growth in EC medium at 44.5°C for 48 hours; Step I + II = Complete curing treatment as described in Material and Methods

Treatment	Total colonies	Lac ⁻ clones	Loss of F_0 lac (%)
Controls			
YT at 37°C	1161	0	0.1
YT at 37°C+ E.B.	409	1	0.25
Experiments^b			
Step I	1898	0	0.1
Step II	2750	2452	89.2
Step I + II	2863	2525	88.2

Results

E. coli cells harbouring the plasmid F_0 lac were used as a model for curing activity determination. No spontaneous curing was observed in non treated growing cells and addition of ethidium bromide at subinhibitory concentration raised the elimination frequency to only 0.25% (Table 2). When the same strain was submitted to the method described by Hill & Carlisle (8), plasmid elimination frequency increased to 88.2%. The same experiment was repeated using only one of the two consecutive steps of the original procedure. Results presented on Table 2 show that step II, i.e., 48 hours incubation at 37°C in EC medium, resulted in plasmid curing frequencies similar to the full treatment (Table 2). These data indicate quite clearly that, in relation to the F_0 lac, the main curing component of the original method was the incubation at 44.5°C in EC medium.

To determine which element was responsible for the curing effect of step II, both parameters, i.e., incubation temperature and the growth medium composition, were analysed further. Table 3 shows the F_0 lac curing temperature dependency. Temperatures below 44.5°C had almost no curing activity, meanwhile temperatures above 45°C resulted in 100% curing of F_0 lac even though cell survival was drastically effected (data not shown). The medium composition was also important to the final curing activity since incubation in NB and minimal medium at the same temperature resulted in no increase of plasmid loss frequency. Curing was also observed in YT medium, but in a less extent than in EC medium (Table 3). Molecular analysis of Lac⁻ colonies

Table 3 - Effect of the temperature and growth medium composition on the curing of F_0 lac^a.

Symbols: a = Numbers represent the sum of at least three separate experiments

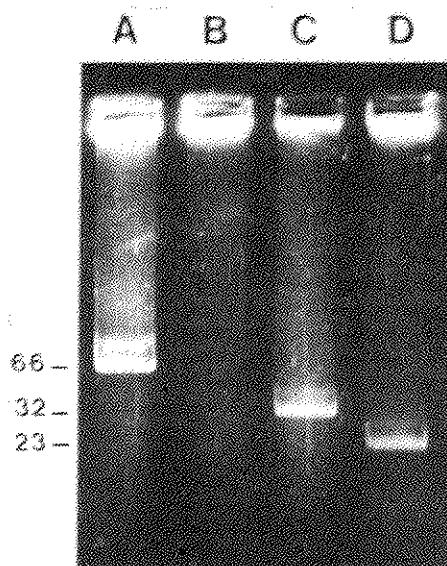
Medium	Incubation temperature (°C)	Total colonies	Lac ⁻ clones	Loss of F_0 lac (%)
EC	40	421	0	0.2
EC	42	658	13	2
EC	44.5	2750	2452	89.2
EC	46	826	826	100
EC	47	485	485	100
YT	44.5	523	185	35.4
NB	44.5	530	0	0.2
M9	44.5	622	0	0.2

Figure 1 - Electrophoretic analysis of *F_olac* samples before and after the curing treatment.

Symbols: A = *E. coli* C600 (*F_olac*); B = *E. coli* C600 cured by the SDS-high temperature incubation treatment; C = *E. coli* C600 (RP4); D = *E. coli* C600 (Sa). The numbers indicate the molecular weights (MD) of the plasmid

obtained after the curing treatment confirmed the disappearance of the 66 MD *F_olac* plasmid (Figure 1).

An initial attempt to apply the SDS-high temperature incubation curing method to *S. typhimurium* was done with two samples recovered from diarrhoeic cases. Table 4 shows that no significant differences in curing frequencies were observed among samples treated with ethidium bromide and those treated with the SDS-high temperature incubation method. Similar results were observed in transconjugants selected for the transfer of the extrachromosomal antibiotic resistance markers to *E. coli* host.



Discussion

It is reported here that the unusual plasmid curing method consisting of consecutive incubation in medium containing SDS and high temperature (8) can result in quite different results as a function of the plasmid studied. In relation to *F_olac* plasmid the incubation at 44.5°C in EC medium proved to be sufficient to induce high elimination frequencies. However, in contrast to other *F_olac* plasmids (11), a temperature sensitive plasmid DNA replication could not be considered as the main factor involved with the high curing frequencies observed. Our results showed that incubation at 44.5°C in different media gave quite different curing frequencies, indicating that other factors besides temperature are involved (Table 3). Adachi & col. (1) reported a strong osmotic pressure dependency on the curing of some extrachromosomal DNA in *E. coli*. However, this factor could not explain the sharp contrast observed in the curing frequencies of the different media tested, since NB and M9 medium show quite different osmotic pressures, and both were unable to support *F_olac* curing.

Our results suggested that the curing activity observed by Hill & Carlisle (8) in their *E. coli* enrichment procedure was probably due to the second step, i.e., the incubation at 44.5°C in EC medium. This possibility was also supported by observations made by other authors where the effective SDS concentration for plasmid elimination were 1% (1, 17, 22) and 10% (10, 20). It should be noted that the final concentration of SDS in the Difco lauryl tryptose broth is only 0.01%.

No relevant increase in the frequency of plasmid elimination was observed with wild *S. typhimurium* strain as well with *E. coli* transconjugants after the SDS-high temperature incubation curing treatment. Other authors described that a single curing procedure can show different plasmid curing efficiencies as a function of the enterobacterial species analysed, indicating some role of the bacterial cell on plasmid stability (16, 22). On the other hand, Toledo & col. (19) reported that a single plasmid can give different results to curing treatments when transferred to other bacterial hosts (16). Some results described in this work indicated that the resistance to curing treatment showed by *S. typhimurium* plasmids is not related to the host genetic background since similar findings were obtained in *E. coli*.

Table 4 - a = Numbers represent the sum of at least three separate experiments; b = As in legend of Table 2; c = Transconjugant obtained after transfer of *S. typhimurium* Ap and Et markers; d = Frequency of loss - total colonies (% cured colonies of curing)

Strain	Treatment ^b	Curing of resistant markers	
		Resistant marker	Frequency of loss ^d
<i>S. typhimurium</i> 17	Step II	Ap	330/3 (0.9)
		Gm	330/10 (3.0)
	Step I + II	Ap	330/0 (0.3)
		Gm	330/10 (3.0)
	YT at 37°C	Ap	330/0 (0.3)
		Gm	330/0 (0.3)
	YT at 37°C+E.B.	Ap	330/0 (0.3)
		Gm	330/9 (2.1)
<i>E. coli</i>	Step I + II	Ap	430/15 (3.5)
		Gm	430/17 (4.0)
<i>S. typhimurium</i> 44	YT at 37°C	Ap	330/0 (0.3)
		Cm	330/0 (0.3)
		Et	330/0 (0.3)
		Km	330/0 (0.3)
	YT at 37°C+E.B.	Ap	330/2 (0.6)
		Cm	330/3 (0.9)
		Et	330/2 (0.6)
		Km	330/3 (0.9)
Step II		Ap	330/0 (0.3)
		Cm	330/1 (0.3)
		Et	330/1 (0.3)
		Km	330/0 (0.3)
Step I + II		Ap	330/0 (0.3)
		Cm	330/2 (0.6)
		Et	330/0 (0.3)
		Km	330/0 (0.3)
<i>E. coli</i> 44 ^c	Step I + II	Ap	330/0 (0.3)
		Cm	-
		Et	330/0 (0.3)
		Km	-

transconjugants (Table 4). This conclusion supports the idea that some plasmids indeed differ in their replication and partitioning mechanisms, and some of them are not subjected to modifications by bacterial host enzymes.

The recent observations of Vicente & de Almeida (21) reporting the successful curing of *S. agona* plasmids could be interpreted as a function of the higher SDS concentration used (0.05%) or an inherent instability of those *S. agona* plasmids.

Our results indicated that the curing method based in SDS high temperature incubation treatment can be used as an alternative technique of plasmid curing. However, the efficiency of the method should be carefully checked for each plasmid studied.

Acknowledgements

We thank Dr. M. Magalhães for the *E. coli* J53 strain; N.C. Leal for the *S. typhimurium* strains; and C.S. Santos for technical assistance. D.M.J. is in receipt of a fellowship from CNPq.

References

1. Adachi, H.; Nakano, M.; Inozuka, M. & Tamoeda, M. - Specific role of sex pili in the effective eliminatory action of sodium dodecyl sulfate on sex and drug resistance factors in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 109:1114-1124, 1972.
2. Anderson, E.S. & Lewis, M.J. - Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*. *Nature*, 208:843-849, 1965.
3. Bouarchad, D.H.; Scavizzi, M.R. & Chabbert, Y.A. - Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. *J. Gen. Microbiol.*, 54:417-425, 1969.

4. Bukhari, A.I.; Shapiro, J.A. & Adhaya, S.L. - DNA insertion elements, plasmids and episomes. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
5. Clowes, R.C.; Moody, E.E.M. & Pritchard, R.H. - The elimination of extrachromosomal elements in thymineless strains of *Escherichia coli* K12. *Gen. Res. Camb.*, 6:147-152, 1965.
6. Evans, D.G.; Silver, R.P.; Evans Jr., D.J., Chase, D.G. & Gorbach, S.L. - Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.*, 12:656-667, 1975.
7. Falkow, S. & Baron, L.S. - Episomic element in a strain of *Salmonella typhosa*. *J. Bacteriol.*, 84:581-589, 1962.
8. Hill, W.E. & Carlisle, C.L. - Loss of plasmids during enrichment for *Escherichia coli*. *Appl. Env. Microbiol.*, 41:1046-1048, 1981.
9. Hirota, Y. & Iijima, T. - Acriflavine as an effective agent for eliminating F-factor in *Escherichia coli* K12. *Nature*, 180:655-656, 1957.
10. Inozuka, N.; Nakamura, S.; Inozuka, M. & Tomoeda, N. - Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of *Escherichia coli* K12 strain. *J. Bacteriol.*, 100:827-835, 1969.
11. Jacob, F.; Brenner, S. & Cuzin, F. - On the regulation of DNA replication in bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 28:329-348, 1963.
12. Kado, C.I. & Liu, S.T. - Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145:1365-1373, 1981.
13. Kawakami, M. & Landman, O.E. - Experiments concerning the curing and intracellular site of episomes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 18:716-724, 1965.
14. Levy, S.B.; Clowes, R.C. & Koenig, E.L., eds. - Molecular biology: pathogenicity and ecology of bacterial plasmids. New York, Plenum Press, 1981.
15. Meynell, G.G. - Bacterial plasmids, conjugation, colicinogeny and transmissible drug-resistance. Cambridge, M.I.T. Press, 1973.
16. Mitsuhashi, S.; Harada, K., Kameda, M. - Elimination of transmissible drug-resistance by treatment with acriflavin. *Nature*, 189:947, 1981.
17. Salisbury, V.; Hedges, R.W. & Datta, N. - Two modes of "curing" transmissible bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.*, 70:443-452, 1972.
18. Taylor, D.E. & Levine, J.G. - Characterization of an H₂ group plasmid mutant defective in maintenance and transfer, and eliminate by novobiocin. In: - Stuttard, C & Rooze, K., eds - Plasmids and transposons: environmental effects and maintenance mechanisms. New York, Academic Press, p.325-352, 1980.
19. Toledo, M.R.F.; Silva, R.M.; Almeida, R.G. & Trabulsi, L.R. - The influence of the host in the curing of F' lac factor by acrydine orange. *Rev. Microbiol.*, (S. Paulo), 8:141-142, 1977.
20. Tomoeda, M.; Inozuka, M.; Kubo, N. & Nakamura, S. - Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate. *J. Bacteriol.*, 93:1078-1089, 1968.
21. Vicente, A.C.P. & de Almeida, D.F. - Identification of multiple-resistance (R) and colicinogeny (Col) plasmids in an epidemic *Salmonella agona* serotype in Rio de Janeiro. *J. Hyg. (Camb.)*, 93:79-84, 1984.
22. Watanabe, T. & Fukasawa, T. - Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. *J. Bacteriol.*, 81:679-683, 1961.
23. Willets, N.S. - The elimination of Flac⁺ from *Escherichia coli* by mutagenic agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27:112-117, 1967.
24. Williams, P.H.; Sedgwick, M.I.; Evans, N.; Turner, P.J., George, R.H. & Mcneish, A.S. - Adherence of an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjugative plasmid. *Infect. Immun.*, 22:393-402, 1978.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA Y MOLECULAR DE PLÁSMIDOS QUE MEDIAN MULTIRRESISTENCIA EN SHIGELLA

Gustavo Prieto
Jeannette Vargas
& Ada Martínez

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

Resumen

Se caracteriza, desde el punto de vista genético y molecular, el contenido plasmídico de resistencia en especies de *Shigella*. El 100% de las cepas (203) poseen multirresistencia extracromosomal que compromete los determinantes de resistencia para sulfas, streptomicina, tetraciclinas, cloramfenicol, kanamicina, neomicina, ampicilina, carbenicilina y cefalosporinas, siendo en el 90% de ellas del tipo plasmidial conjugativa autotransferible y el 1% restante no autotransferible pero movilizable representado por el plásmido r(Su-St). Un plásmido puede mediar la multirresistencia presente o lo hacen dos o más plásmidos, frecuentemente autotransferibles y no autotransferibles que al coexistir crean un estado celular poliplasmidial que puede proporcionar para sulfas, streptomicina, ampicilina y carbenicilina una doble o triple garantía de resistencia. Los plásmidos autotransferibles identificados pertenecen a los grupos incompatibles B, I₁, FII y un plásmido, el cual parece ser ubicuo en nuestro medio, que se transfiere mejor a 37°C que a 28°C, es f_{if}^t, no produce restricción en el esquema fágico de *S. typhimurium* fagotipo 36, no propaga los fagos μ^2 y fd, su peso molecular es de 46×10^6 daltons y se muestra compatible con plásmidos de grupos conocidos, pero incompatible entre sí y con plásmidos aislados en nuestro medio en serotipos de *Salmonella* por lo cual probablemente pertenecen a un mismo "nuevo" grupo incompatible. El determinante Am-Cb puede estar presente en células de especies diferentes y en una misma célula en plásmidos de diferentes grupos incompatibles lo cual es indicativo de su amplia difusión en shigelias. Este estudio es útil como trazador epidemiológico y para conocer la evolución de la emergencia de resistencia plasmidial en *Shigella*.

Summary

Genetic and molecular characterization of plasmids that mediate multiresistance in Shigella

A genetic and molecular characterization of the plasmid content mediating resistance in *Shigella* species was done. One hundred percent of 203 strains have extrachromosomal multiresistance that involve determinants for sulfonamides, streptomycin, tetracyclines, chloramphenicol, kanamycin, neomycin, ampicillin, carbenicillin and cephalosporins. Ninety-nine percent of the strains

show autotransferable conjugative plasmids responsible for the resistance. The remaining 1% has the plasmid r(Su-St) which is not transferable but capable of mobilization. The multiresistance can be mediated by one, two or more than two plasmids, which frequently present themselves as a mix of conjugative and non-conjugative plasmids that create a polyplasmidial cellular state that provides a double or triple warranty of resistance to sulfonamides, streptomycin, ampicillin and carbenicillin. The identified conjugative plasmids belong to the incompatibility groups, B, I₁, FII. One plasmid which is ubiquitous in our environment, is better transferred at 37°C than at 28°C, is f⁺, does not produce any restriction in the phage-typing scheme of *S. typhimurium* phage type 36, does not propagate phages λ^2 and fd; it has a molecular weight of 46×10^6 daltons and is compatible with plasmid groups known, but incompatible with each other and with other plasmids having the same characteristics of plasmids isolated from *Salmonella* serotypes in our environment, and because of this it believed that these plasmids belong to a "new" incompatibility group. The resistance determinant Am-Cb can be present in different species cells or in the same bacterial cell in plasmids of different incompatibility groups indicating that it has become widespread among *Shigella* strains. This study is useful as an epidemiological tracer and should help to understand and follow-up the resistance arising in *Shigella* species.

Introducción

Estudios reportados en Venezuela en el año 1970 (19) en cepas de *Shigella* mostraron que la multirresistencia presente en el 84% de las cepas y que incluía los determinantes de resistencia para sulfas, streptomicina, tetraciclinas, kanamicina, neomicina y cloramfenicol era del tipo transferible por conjugación. Igual modalidad fue demostrado asumió la resistencia a ampicilina y carbenicilina detectada en shigelas aisladas en 1972 (21).

En la actualidad es conocido que cuando una bacteria muestra un patrón de resistencia, frecuentemente del tipo múltiple, y posee capacidad para transferirla por conjugación a otra, como es el caso de nuestras shigelas, es debido a la presencia en ella de un elemento genético extracromosomal del tipo de los plásmidos conjugativos (3, 5, 9, 11).

En Venezuela el uso indiscriminado de los antibióticos es altamente notorio y ello se conoce es un agente selectivo poderoso para la diseminación de elementos plasmidiales que median resistencia a los mismos, y lo es en tal magnitud que ésta se ha convertido por su frecuencia en el tipo de resistencia predominante en bacterias comensales o patógenas del hombre y animales (2, 5, 9, 10, 20).

Un estudio de 1.369 cepas de *Shigella* aisladas en Venezuela durante los años 1968-1982 (23) mostró la presencia de resistencia y resistencia múltiple en el 89% y el 84% respectivamente, por lo cual se ha creido de utilidad caracterizar ésta resistencia desde el punto de vista genético y molecular.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas - Siguiendo la metodología descrita por Anderson y Lewis (2) 203 cepas fueron investigadas por la presencia de resistencia extracromosomal mediada por plásmidos y en base a la existencia de multirresistencia plasmidial conjugativa, 10 cepas representantes de las especies de *Shigella* mas frecuentemente aisladas en nuestro medio, fueron seleccionadas para el estudio genético y molecular de sus plásmidos.

Las siguientes cepas de *Escherichia coli* K12 fueron utilizadas: F⁻ lac^r nal^r, Hfr, F⁺, portadoras de los factores de transferencia X y A.

Las cepas standard de *Salmonella typhimurium* utilizadas fueron las siguientes: fagotipo 36 pl^r, S500^r, Col B, Col E, Col E1, Col E2, Col I, Col Ia, Col Ib, Col I + Col E, Col K y Col V.

Las cepas portadoras de los plásmidos de resistencia de grupos incompatibles conocidos utilizadas en el estudio son listadas en las Tablas 1 y 2.

Plásmidos - Los plásmidos utilizados para determinar el peso molecular mediante electroforesis en gel de agarosa conjuntamente con sus P.M. en daltons x 10⁶ y sus marcadores, fueron los siguientes: Col E1, 4.7, TP193, 20.2; Sa (Su-St-Kn-Cm) 25.9; TP120 (Su-St-Te-Am) 31.7; RI-19K^r (Su-St-Cm-Am) 54.2; TP125 (Su-St-Te-Cm) 64.0 y TP129 (Te) 77.6.

Fagos - Se utilizaron los fagos μ^2 y fd específicos de F, el fago If., específico de I y un conjunto de 30 fagos para la tipificación de *Salmonella typhimurium*.

Caracterización genética y molecular - Para la caracterización genética y molecular de los plásmidos de resistencia se utilizan los parámetros que a continuación se mencionan: determinación e identificación de plásmidos colicinogénicos (13); transferencia directa de plásmidos mediante cruces sobre la noche, cruces dobles y cruces interrumpidos (2, 8); determinación del Factor de Transferencia (FT) y transferencia de plásmidos de resistencia no autotransferibles, mediante movilización en cruces triparenterales (4, 5); capacidad de inhibir o no la fertilidad (18); habilidad de estimular o no a su huésped a sintetizar fimbrias del sexo, lo cual le permitiría la propagación de sus fagos específicos (14); producción de restricción fágica modificando el patrón lítico de *S. typhimurium* fagotipo 36 ante un conjunto de 30 fagos (1, 7); determinación de grupos incompatibles por su capacidad de coexistir o no con otros plásmidos (15); aislamiento y medida del ADN plasmídico para su caracterización molecular (16).

Resultados

En 200 (99%) de las cepas investigadas por presencia de resistencia extracromosomal se logra demostrar la transmisión de resistencia directa mediante plásmidos autotransferibles. En el 93% de estas la transmisión de la resistencia es completa y en el 7% es incompleta por el fracaso en la transferencia de determinantes de resistencia para tetraciclinas, cloramfenicol y sulfas. El 1% restante está representado por el plásmido no autotransferible pero movilizable r (Su-St).

Los estudios genéticos muestran que el contenido plasmídico de resistencia en shigelas puede asumir las siguientes modalidades: presencia de un estado monoplasmidial autotransferible como el observado en las cepas *Sh. flexneri* 4831 en la cual la resistencia está codificada por el plásmido R (Su-St-Te-Cm-Kn-Nm) grupo incompatible F_{II} o en la cepa *Sh. sonnei* 5593 con el plásmido R (Su-St-Te-Cm) el cual es uno que se transfiere mejor a 37°C que a 28°C, en los estudios de inhibición de la fertilidad realizados con las cepas *E. coli* K12 Hf^r 27R207 y *E. coli* F⁺ 31R892 muestra que es capaz de provocar inhibición de la fertilidad y por tanto es fit, no propaga los fagos μ^2 y fd, no

Tabla 1 - Cepas standard. Grupos incompatibles

Cepa N°	Especie	Plásmido	Grupo incompatible
27R191	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Te	F
33R309	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Te	F _I
48R371	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Am	F _I
44R241	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Te	F _{III} F _{IME}
28R675	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Te	F _{II}
40R412	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r	Te	F _{IV}
42R352	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Am	MP10
38R391	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Te	H ₁
80T104	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Am	F-like
80T71	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Am	F-like
40R327	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Te	B
R473	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r	Am	L
113	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	St-Te	L
35R263	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Te	N
38R456	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	St-Am	N
37R273	<i>E. coli</i> K12 F ^r lac ^r nal ^r	Kn-Am	N
79T32	<i>S. typhimurium</i>	Kn-Am	N
79T51	<i>S. typhimurium</i>	St-Am	N

produce restricción en el esquema fágico de *S. typhimurium* fagotipo 36, se muestra compatible entre sí y con plásmidos aislados en nuestro medio en cepas de *S. typhimurium* y *S. java*, que muestran las mismas características y cuya denominación dentro de los grupos incompatibles está por ser asignada. Su peso molecular es de 46×10^6 daltons y su banda electroforética en gel de agarosa puede ser apreciada en las columnas 6,7 de la Figura 1; presencia de un estado poliplasmidial por plásmidos autotransferibles como los observados en las cepas *Sh. sonnei* 803 y *Sh. flexneri* 479 las cuales llevan los plásmidos

R (Su-St-Te-Am-Cb) y R (Su-St-Am-Cb-Cr) grupo incompatible B y R (St-Kn-Nm-Am-Cb) y R (Su-St-Am-Cb-Cr) estos últimos presentando las mismas características genéticas del plásmido R (Su-St-Te-Cm) descrito anteriormente en la cepa de *Sh. sonnei* 5593; presencia de un estado poliplasmidial por cohabitar plásmidos autotransferibles y no autotransferibles como es el observado en las cepas de *Sh. sonnei* 4124 que lleva los plásmidos autotransferibles R (Te) grupo incompatible B y R (Am-Cb) grupo incompatible I₁, el cual ocasiona restricción de los fagos 12 y 13 del esquema fágico de *S. typhimurium* convirtiéndolo del tipo 36 al 125, lo cual permite su caracterización como I₁^M, en *Sh. dysenteriae* 906 que posee los plásmidos autotransferibles R (Am-Cb) grupo incompatible I₁ y R (Su-St-Te-Cm-Kn-Nm) grupo incompatible F_{II} y en *Sh. flexneri* 604 con los plásmidos autotransferibles R (Te) grupo incompatible B y R (Kn-Nm-Am-Cb) grupo incompatible I₁. Cada una de estas 3 cepas completan su dotación plasmidial de resistencia con un plásmido no autotransferible r (Su-St); presencia de un estado monoplasmidial no autotransferible representado por el determinante de resistencia r (Su-St), presente en las cepas *Sh. boydii* 105 y 489 y *Sh. flexneri* 5014, movilizable hasta un receptor

Tabla 2 - Cepas standard. Grupos incompatibles

Cepa N°	Especie	Plásmido	Grupo Incompatible
29R924	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺ nal ^r	Te	I ₁
78T16	<i>S. typhimurium</i>	Kn	I ₁
13R108	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	Am	I ₁
38R167	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	Kn	I ₂
40R646	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	Te-Kn-Am	P
37R491	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺ nal ^r	Am	nuevo
37R520	<i>S. typhimurium</i>	Am	nuevo
402	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺ nal ^r	St-Am	T
779	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	Su-St-Te	U
7K	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	Am	W
200	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	St-Am	X
949	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	St-Kn	Z
33R816	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺	Te	41
35R875	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺ nal ^r	Am	42
42R644	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺ nal ^r	Su-Kn-Am	com 6
42R617	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺ nal ^r	Su-St-Te-Gm	com 7
33R404	<i>E. coli</i> K ₁₂ F ⁻ lac ⁺ nal ^r	Kn-Am-Gm	com 7

Figura 1 - 6 = Plásmido grupo nuevo de *Sh. sonnei* 5593 de peso molecular 46×10^6 el cual codifica la resistencia St-Kn-Nm-Am-Cb. Se observa además un plásmido críptico de peso molecular 35×10^6 .

3 = Plásmido de *Sh. sonnei* 5593 de peso molecular 5×10^6 el cual codifica por Col E₁.

4/5 = Contienen sólo plásmidos de peso molecular conocido. Las bandas electroforéticas comunes en cada una de las columnas corresponden a dos plásmidos de peso molecular conocido

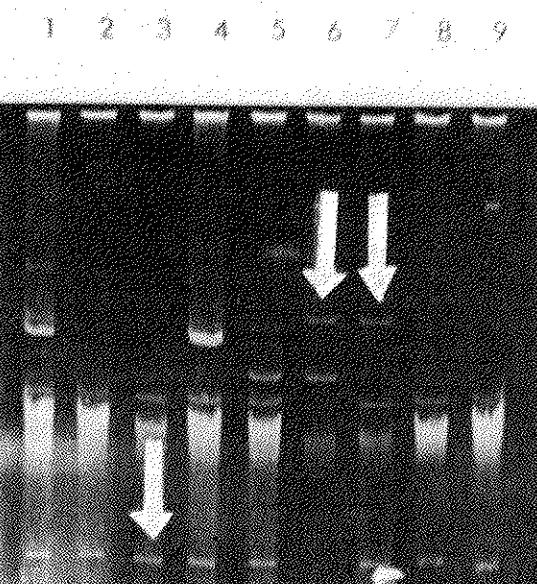


Tabla 3 - *Shigella*. 203 cepas, caracterización genética de los plásmidos.

Símbolos: 1 = En *S. typhimurium*; nr = No restringe; n = Ninguna; = No se practica; * = A ser determinada

Expresión fenotípica de la resistencia	Plásmidos identificados	Inhibición de la fertilidad	Fago propagado	Restricción de fagos ¹	Grupo incompatible	
	Autotransferibles No autotransferibles					
4831 (<i>Sh. flexneri</i> B1) Su-St-Te-Cm-Kn-Nm	R(Su-St-Te-Cm-Kn-Nm)	f1+	fd	nr	III	
5593 (<i>Sh. sonnei</i>) Su-St-Te-Cm	R(Su-St-Te-Cm)	r (Col E ₁)	f1+	n	nr	nuevo
503 (<i>Sh. sonnei</i>) Su-St-Te-Cm-Kn-Nm-Am-Co	R(St-Kn-Nm-Am-Co) R(Su-St-Te-Am-Co)	r (Col E ₁)	f1+ f1-	n	nr	nuevo
479 (<i>Sh. flexneri</i>) Su-St-Te-Cm-Kn-Nm-Am-Co-Cr	R(Su-St-Am-Co-Cr) R(Te-Cm-Kn-Nm)	r (Su-St)	f1+ f1-	n	nr	nuevo
4124 (<i>Sh. sonnei</i>) Su-St-Te-Am-Co	R(Am-Co) R(Te)	r (Col E ₁)	f1- f1-	If ₁ n	125 nr	I ₁ / B
906 (<i>Sh. dysenteriae</i>) Su-St-Te-Cm-Kn-Nm-Am-Co	R(Su-St-Te-Cm-Kn-Nm) R(Am-Co)	r (Su-St)	f1+ f1-	fd If ₁	nr nr	III I ₁
604 (<i>Sh. flexneri</i>) Su-St-Te-Kn-Nm-Am-Co	R(Kn-Nm-Am-Co) R(Te)	r (Su-St)	f1- f1-	*	*	I ₁ B

apropiado mediante los factores de transferencia X y/o Δ.

Las 3 cepas de *Sh. sonnei* estudiadas llevan además un plásmido colicinogénico Col E₁. En la cepa *Sh. sonnei* 5593 éste tiene un peso molecular de 5×10^6 daltons y su banda electroforética puede ser apreciada en la columna 3 de la Figura 1.

Las Tablas 3 y 4 resumen todas las características genéticas de los plásmidos identificados.

Discusión

Los resultados de este estudio ratifican los hallazgos reportados anteriormente en lo relativo a que la resistencia presente en las diferentes especies y serotipos de *Shigella* asume frecuentemente la modalidad de ser transferible por conjugación (19, 21).

Algunas cepas de *Shigella* pueden contener toda su información genética de resistencia, con determinantes de resistencia a varios agentes antimicrobianos, en un solo plásmido. En otras, plásmidos de resistencia cohabitán en una misma célula bacteriana creando un estado poliplasmídial, en algunas de esta última modalidad ello les proporciona a antimicrobianos como sulfas, streptomicina, ampicilina y carbenicilina una doble o triple garantía para que la cepa se exhiba resistente a los antibióticos mencionados.

Los determinantes de resistencia para varios agentes antimicrobianos presentes en estas shigelas pueden estar constituyendo plásmidos que desde el punto de vista de la resistencia que median en cepas diferentes o aún en una misma cepa de *Shigella*, pueden ser similares o muy parecidos en su patrón de resistencia, aun cuando los plásmidos sean en realidad genéticamente diferentes. Esta similitud existente en plásmidos diferentes ha llevado a asumir alguna interrelación epidemiológica entre los procesos infecciosos producidos por enteropatógenos que la poseen como es el caso del plásmido caracterizado en la *Sh. dysenteriae* A₁ que durante los años 1968-1969 produjo un brote epidémico en Centro América (17) y el detectado en *S.*

Tabla 4 - *Shigella*. 203 cepas. Plásmidos de resistencia no autotransferibles. Movilización.

Símbolos: 1 = *E. coli* K₁₂ F⁻lac^rnal^r 14R525; 2 = *E. coli* K₁₂ lac^r 18R951 llevando el factor de transferencia x; 3 = *E. coli* K₁₂ lac^r 27R503 llevando el factor de transferencia Δ

Expresión fenotípica de la resistencia	Factor de transferencia <i>E. coli</i> 18R951 ²	Factor de transferencia <i>E. coli</i> 27R503 ³	Expresión genotípica de la resistencia transferida a <i>E. coli</i> ¹
5014 (<i>Sh. flexneri</i> B ₂) Su-St	X	Δ	X (Su-St) Δ (Su-ST)
105 (<i>Sh. boydii</i> C ₁₀) Su-St	X	Δ	X (Su-ST)
489 (<i>Sh. boydii</i> C ₁₀)	X	Δ	Δ (Su-St)

typhi durante el brote de fiebre tifoidea ocurrido en México en el año 1972 (9). Cepas de ambas especies mostraban patrones de resistencia idénticos (Te-Su-St-Cm), pero la caracterización genética de sus plásmidos reveló que epidemiológicamente no había tal correlación, ya que ambos plásmidos pertenían a grupos diferentes, siendo el de *Sh. dysenteriae* A₁ uno de grupo incompatible B y el de *S. typhi* uno del grupo incompatible H₁ (12, 16).

El plásmido de resistencia no autotransferible por conjugación que media resistencia para streptomicina y sulfas y que está presente en las cepas 4124, 906, 604, 105, 589 y 5014 es bien conocido como el determinante de resistencia que más frecuentemente se encuentra en forma "libre" en enterobacterias (3) y que en nuestras cepas asume características similares a las descritas por Anderson en *S. typhimurium* fagotipo 29 (6), por lo menos en cuanto a su movilización mediante la utilización de triple cruce y a su asociación en clase 2 con el segmento FT de los plásmidos autotransferibles cuando coexisten con él.

En ninguna de las cepas de *Shigella* que mostraron resistencia a ampicilina y carbenicilina hemos observado segregación de los genes que median esta resistencia, lo cual es debido probablemente a que es uno mismo el responsable de tal resistencia, lo mismo ocurriría en la cepa *Sh. flexneri* 479 que muestra además resistencia a las cefalosporinas. Otros estudios (20, 23) han mostrado que esta cepa y otras shigelas que poseen este tipo de resistencia tampoco presentan segregación de genes de esta resistencia y los niveles de resistencia más bajos alcanzados para cefalosporinas pudieran ser indicativos de que las cepas que llevan plásmidos que soportan estos determinantes son capaces de producir una beta-lactamasa que escinde mejor el anillo B-lactam de ampicilina y carbenicilina que el del núcleo cefalosporínico, no obstante, les proporciona niveles de resistencia clínicamente significantes. Es notorio en los resultados obtenidos que el determinante de resistencia para ampicilina y carbenicilina presente en las cepas de *Shigella* está constituyendo en ellas parte de diferentes plásmidos, los cuales pertenecen a la mayoría de los grupos incompatibles identificados en las cepas estudiadas, o sea, que integran plásmidos pertenecientes a los grupos incompatibles I₁, B y al nuevo grupo incompatible por ser designado, ello es indicativo que este determinante ya ha sufrido una amplia difusión dentro de los plásmidos presentes en *Shigella*.

Los dos plásmidos del grupo F caracterizados en este estudio presentes en las cepas 4831 y 906 compartieron la característica de los plásmidos miembros de este grupo de propagar el fago fd, pero fueron incapaces de propiciar la propagación del fago λ^2 lo cual es una característica que se observa en una minoría de los plásmidos pertenecientes a este grupo. Esto conlleva a contemplar la posibilidad que en estas cepas, los receptores de superficie para ambos fagos sean diferentes.

Plásmidos grupo incompatible B, FII, e I₁ parecen estar bastante difundidos en

shigelas y otros enteropatógenos en nuestro medio (22). De igual ubicuidad parece también gozar el plásmido que hemos denotado como plásmido "nuevo" y que está siendo clasificado en la "Division of Enteric Pathogens, Enteropathogens Reference Laboratory" de Londres.

El poder colicinogénico en las shigelas estudiadas estuvo presente sólo en *Sh. sonnei*. El tipo de colicina producida es en todas ellas del grupo E₁ lo cual puede significar que esta propiedad de colicinogenicidad tenga alguna correlación epidemiológica entre ellas. La producción de colicina en estas cepas es también codificada por un plásmido no autotransferible, el cual coexiste en estas bacterias con aquellos plásmidos que median la resistencia presente en ellas y contribuye a la creación de su complejo plasmídico.

Desde el punto de vista médico este estudio puede resultar de utilidad al contribuir a determinar la ecología de la emergencia de resistencia a los agentes antimicrobianos que se introduzcan para el tratamiento de la shigelosis ya sea por que estos nuevos determinantes de resistencia pasen a integrar nuevos plásmidos o se sumen a los ya existentes en plásmidos presentes anteriormente en *Shigella* e igualmente desde el punto de vista epidemiológico al permitir afirmar o negar la interrelación de casos o brotes producidos por una especie o serotipo de *Shigella*, en una misma o diferente área geográfica o institución.

Referencias Bibliográficas

1. Anderson, E. & Williams, R. - Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology. *J. Clin. Pathol.*, 9:94-127, 1956.
2. Anderson, E. & Lewis, M. - Drug resistance and its transfer in *Salmonella typhimurium*. *Nature (London)*, 206:579-583, 1965.
3. Anderson, E. & Lewis, M. - Characterization of transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhimurium*. *Nature (London)*, 208:843-849, 1965.
4. Anderson, E. - A rapid screening test for transfer factors in drug sensitive Enterobacteriaceae. *Nature (London)*, 208:1016-1017, 1965.
5. Anderson, E. - Origen of transferable drug-resistance factor in the Enterobacteriaceae. *Brit. Med. J.*, 2:1289-1291, 1965.
6. Anderson, E. - The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 22:131-180, 1968.
7. Anderson, E., Threlfall, E., Carr, J. & Savoy, L. - Bacteriophage restriction in *Salmonella typhimurium* by R factors and transfer factors. *J. Hyg. (Camb.)*, 71:619-631, 1973.
8. Anderson, E. & Threlfall, E. - The characterization of plasmids in the enterobacteria. *J. Hyg. (Camb.)*, 72:471-478, 1974.
9. Anderson, E. - Transferable drug resistance in *Salmonella* in South and Center America. *WHO Wkly. Epidemiol. Rec.*, 8:65-69, 1974.
10. Cohen, S. - Ecology consequences of resistance transfer factors. *Am. J. Clin. Nut.*, 23:1480, 1970.
11. Datta, N. - Infectious drug resistance. *Brit. Med. Bull.*, 21:254-259, 1965.
12. Datta, N. & Olarte, J. - R factors in strains of *Salmonella typhimurium* and *Shigella dysenteriae* isolated during epidemics in Mexico: classification by compatibility. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5:310-317, 1974.
13. Fredericq, P. - Actions antibiotiques reciproques chez les Enterobactériaceae. *Revue Belge Pathologie Et Medicine Experimentale*, 19 (supplement IV):1, 1948.
14. Grindley, J. & Anderson, E. - I-like resistance factors with the f1⁺ character. *Genet. Res.*, 17:267-271, 1971.
15. Grindley, N.; Grindley, J. & Anderson, E. - R factors compatibility groups. *Mol. Gen. Genet.*, 119:287-297, 1973.
16. Grindley, N.; Humphreys, C. & Anderson, E. - Molecular studies of R factor compatibility groups. *J. Bacteriol.*, 115:387-398, 1973.
17. Mata, L.; Mendizabal-Morris, C.; Gangarosa, E. & Perera, D. - A central american epidemic of bacillary dysentery due to *Shigella dysenteriae* type I (*Shiga bacillus*) confused with amebiasis. *Tenth International Congress for Microbiology: abstracts*, 1970.

18. Piton, J. & Anderson, E. - The inhibitory action of transfer factors on lysis of *Escherichia coli* K12 by phages λ^2 and $\phi 2$. *Genet. Res.*, 16:215-224, 1970.
19. Prieto, G. - Estudio de la susceptibilidad de 58 cepas de *Shigella* a 13 agentes antimicrobianos: factores "R" como determinantes genéticos responsables de su resistencia múltiple. *Rev. Fac. Med. (Maracaibo)*, 3:170-192, 1970.
20. Prieto, G. - Contribución de la resistencia episomal (factor R) a la multirresistencia de las salmonelas. *Rev. Fac. Med. (Maracaibo)*, 6:14-37, 1973.
21. Prieto, G.; Martínez, A.; Vargas, J. & Martínez, N. - Multirresistencia en *Shigella* mediada por factores "R" que incluyen el determinante de resistencia para ampicilina-carbenicilina. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 6:81-89, 1975.
22. Prieto, G.; Martínez, A.; Vargas, J.; Lares, A.; Marín, C. & Bracho, A. - Nuestros enteropatógenos en los últimos 15 años: su etiología y resistencia incluyendo caracterización genética y molecular de sus plásmidos. Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Venezuela, 1983. (Trabajo presentado para optar el premio "Julio Arraga Zuleta").
23. Prieto, G.; Martínez, A. & Cepeda, I. - Prevalencia y evolución de la resistencia en *Shigella* aisladas en Venezuela. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 16:101-112, 1985.

Errata

Caracterização sorológico de amostras de *Vibrio parahaemolyticus* isoladas de peixes capturados no litoral brasileiro. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 17(4), p.328, 1986.

ONDE SE LÊ: Exetuando-se, *Vibrio cholerae* 01, a maior ênfase nas pesquisas se concentrou sobre *V. parahaemolyticus*, reconhecido como um dos principais agentes de processos ubiquíndade no universo marinho.

LEIA-SE: Exetuando-se, *Vibrio cholerae* 01, a maior ênfase nas pesquisas se concentrou sobre *V. parahaemolyticus*, reconhecido como um dos principais agentes de processos de toxinfecção alimentar, em determinadas regiões do mundo e por sua extraordinária ubiquíndade no universo marinho.

p.329. ONDE SE LÊ: sorológicos concorrentes 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 informações de importância, para os futuros ensaios bacteriológicos, ecológicos e epidemiológicos.

LEIA-SE: sorológicos ocorrentes em regiões não endêmicas, não deixam de representar informações de importância, para os futuros ensaios bacteriológicos, ecológicos e epidemiológicos.

p.330. ONDE SE LÊ: Em síntese, os resultados obtidos demonstram a ampla difusão do microrganismo em de toxinfecção alimentar, em determinadas regiões do mundo e por sua extraordinária

LEIA-SE: Em síntese, os resultados obtidos demonstram a ampla difusão do microrganismo em nosso litoral, admitindo-se que as influências impostas pela sazonalidade, tão evidente em outras áreas do mundo (11), não apresentam a mesma repercussão nas...

Aplicação de uma técnica de ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") no diagnóstico direto do vírus da febre aftosa. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 18(1):12-24, 1987.

Inclusão da Tabela 1 faltante.

Tabela 1 - Títulos de amostras de diferentes subtipos do VFA na reação de fixação de complemento (RFC) e no ELISA.

Símbolos: a = Recíproca da diluição de suspensão antigênica que corresponde a 50% de hemólise na técnica de Camargo & col. (1050); b = Recíproca da maior diluição da suspensão antigênica, determinada por interpolação gráfica, que fornece uma densidade óptica 2 vezes superior aos controles da reação

Amostras dos subtipos do VFA	Natureza do Antígeno	Título na RFC ^a	Título no ELISA ^b			Relação ELISA/RFC
			Anti-O,A e C	Anti-146S O ₁	Anti-VFA Búfalo	
O ₁ (1)	Susp. de céls. BHK-21	22	944	1380	-	42,9/62,7
O ₁ (2)	Susp. de camundongo	20	-	1600	-	80
O ₁ (3)	Epitélio Coxim plantar de cobaio	40	-	1600	-	40
A ₂₄ (1)	Susp. de céls. BHK-21	11	282	-	-	25,63
Avenceslau (1)	Susp. de céls. BHK-21	10	-	-	335	33,5
Avenceslau (2)	Susp. de céls. BHK-21	16	-	-	412	25,75
Avenceslau (3)	Epitélio Lingual bovino	6	-	-	23	3,83
C ₃ (1)	Susp. de céls. BHK-21	18	767	-	-	42,6

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SEM

Alimentação, 80:1-56, set./out. 1985.

A revista Alimentação, publicada bimestralmente pela ABIA (Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação), divulga notícias (V. Seções: Destaques, Atividades ABIA; Empresas & Produtos, Guia do Comprador), informes técnico-científicos (V. Seções: Destaques, Opinião) e também artigos originais de pesquisa.

O fascículo em questão traz matéria sobre estudos com o krill antártico, atualmente desenvolvidos por pesquisadores da USP. A potencialidade da Biotecnologia na produção de alimentos é discutida na Seção Opinião. Também é apresentado um artigo sobre aproveitamento de vegetais numa província da União Soviética, assunto cujo conteúdo ficou prejudicado pela tradução que não deve ter passado por revisor técnico.

Este número traz também artigo de pesquisa em Nutrição, que analisa a situação alimentar de dois grupos populacionais de baixa renda do Estado do Pará.

A revista Alimentação é indexada pelo Chemical Abstracts Science, Bio-Sciences Information Service of Biological Abstracts e Commonwealth Bureau of Nutrition.

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

Encontro Estadual de Especialistas em Digestão Anaeróbia, São Paulo, 25-27 de setembro de 1985: conclusões e recomendações de políticas para o setor.

Sugestões na área de microbiologia:

1. *Do ponto de vista sanitário, deverão ser estimuladas pesquisas sobre - a. qualidade microbiológica dos biofertilizantes onde deverão ser considerados patógenos de origem humana e de animais; b. estudos epidemiológicos sobre riscos à saúde relativos à utilização de biofertilizantes; c. interferência dos aterros sanitários na qualidade de águas subterrâneas; d. normas para aplicação de biofertilizantes e estudos sobre riscos de disseminação de patógenos dependendo do processo de aplicação; e. efeitos de processos de tratamento na eliminação de patógenos presentes nos lodos.*

2. *Do ponto de vista do processo - a. Estudos sobre ecologia do biodigestor; b. cursos de especialização sobre métodos e microbiologia do processo da biodigestão.*

3. *Do ponto de vista ecológico - a. estudos sobre as interações da microbiota do solo e biofertilizantes; b. estudos sobre interação da microbiota do solo e poluentes.*

Justificativa

Não existem dados suficientes nem metodologia completamente estabelecida, principalmente no referente a patógenos e mais ainda para estudos dos microrganismos do processo.

Faltam recursos humanos capacitados para pesquisa, análises e interpretação dos resultados.

No que se refere à normatização sobre qualidade, aplicação e disinfeção dos

biofertilizantes, esta ficará extremamente prejudicada por falta de informações básicas devido à pouca ênfase e estímulo a pesquisas neste tema.

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

Hidrólise enzimática de biomassa: Anais. Maringá, Fundação Universidade Estadual de Maringá, Seminário, 24/25 outubro de 1983, 131p., 1983.

Nesta publicação estão reunidas as principais informações apresentadas no Seminário e Workshop realizados nos dias 24 e 25 de outubro de 1983 na Universidade Estadual de Maringá, Paraná. Esses eventos tiveram como objetivos principais: a) reunir os pesquisadores nacionais ligados à área de biomassas, com a finalidade de aumentar o intercâmbio de informações; b) propiciar a vinda de consultores internacionais, com ênfase especial, à área de hidrólise de resíduos celulósicos com enzimas ou células na fase líquida e imobilizadas, com o objetivo de ministrar conferências nesta área e c) promover um Workshop para debater entre os consultores e os presentes, os principais obstáculos encontrados na aplicação comercial de processos que utilizam enzimas ou células imobilizadas, bem como, estratégias para superá-los. O produto final do Workshop deveria ser um documento que contivesse um programa de estratégias e recomendações a adotar, a fim de se incentivar a aplicação da tecnologia de enzimas imobilizadas no país, tanto a nível de pesquisa tecnológica, como a nível de planta-piloto e industrial.

A primeira conferência foi apresentada pelo Dr. George Emert (University of Arkansas) e versou sobre o tema "Conversão de celulose a produtos químicos, incluindo etanol". O conferencista considera a possibilidade de se utilizar lixo urbano, resíduos de fábrica de papel e resíduos agrícolas para a produção de etanol. As diversas etapas de processo são discutidos, com ênfase para o pré-tratamento; produção de celulases por mutantes de *Trichoderma reesei* QM 6a; sacariação e fermentação simultânea, sendo a fermentação feita utilizando-se *Candida brasiliæ*. Para uma planeta processando 50t/dia de lixo, os custos de produção de etanol foram estimados entre 0,28 e 0,34 dólares por litro.

A segunda conferência foi apresentada pelo Dr. Herbert Klei (University of Connecticut) e abordou o tema "Uso de células imobilizadas para a produção de álcool". O apresentador discute a conversão de xilose a etanol utilizando *Pachysolen tannophilus* imobilizado em alginato de cálcio e a produção de etanol por fermentação de açúcares, utilizando leveduras ou bactérias (*Zymomonas mobilis*) imobilizadas em diversos materiais. Por último, considera o uso de técnicas de ADN recombinante para a obtenção de leveduras ou bactérias capazes de hidrolisar a celulose e fermentar os açúcares obtidos a etanol.

Após as conferências houve uma seção de apresentação de programas de atividades e resultados, feita pela BIOFERM/BioBrás, pelo Departamento de Engenharia Química da Universidade Estadual de Maringá e pela Sinop-Aroquímica. Seguiu-se uma seção de apresentação de resultados de pesquisa, com participação da FTI, UNICAMP e Universidade Federal de São Carlos.

Foram também expostos 15 posters, nos quais diversas instituições abordavam, para resíduos celulósicos e amido, aspectos como: imobilização de enzimas; pré-tratamento, tipos de reatores; degradação enzimática de steviosídios; produção de enzimas, fermentação de pentoses, etc.

A parte inicial do Workshop constou de duas conferências. A primeira proferida pelo Dr. Jonathan Woodward (Oak Ridge National Lab) versou sobre "Barreiras a superar de forma que se alcance sucesso comercial com celulases imobilizada". A seguinte, proferida pelo Dr. Herbert Klei abordou "Sucesso comercial com células microbianas e enzimas imobilizadas.

A segunda parte constou das atividades dos três grupos de trabalho estabelecidos. Os grupos elaboraram diversas recomendações e definiram prioridades a nível de

pesquisa de laboratório e de planta piloto.

Em síntese consideramos a publicação de grande interesse, a qual demonstra que os organizadores atingiram basicamente todos os objetivos a que se propunham. O Seminário é um marco importante na pesquisa de enzimologia aplicada no Brasil e por isso a Universidade Estadual de Maringá e as entidades que apoiaram financeiramente o evento: PNUD/UNESCO, FINEP, CAPES e a Fundação Universidade Estadual de Maringá estão de parabéns.

Américo Martins Craveiro
Agrupamento de Biotecnologia
Instituto de Pesquisas Tecnológicas
do Estado de São Paulo - IPT
Caixa Postal 7141
05508 São Paulo SP

Medilab: Revista Mundial de Laboratórios Médicos, 6/7:1-52, 1985.

Comentário sobre o artigo "Diagnostic significance of alkaline phosphatase isoenzymes", p.18.

O artigo é atual e interessa a laboratoristas e clínicos. O autor condensou dados recentes, como pode ser visto pela bibliografia apresentada, veiculando as informações de forma clara e objetiva. A apresentação do assunto está bastante ordenada permitindo aos leitores, mesmo àqueles que não trabalham diretamente com enzimologia, uma visão mais aprofundada sobre isoenzimas da fosfatase alcalina e de sua utilidade no diagnóstico e acompanhamento das doenças. Outro ponto importante a ser salientado é a experiência própria relatada pelo autor em relação ao aparecimento da isoenzima intestinal da ALP nas colestases intra-hepáticas e sua ausência nas colestases extra-hepáticas e também em relação aos imunocomplexos de ALP nas neoplasias, visto que este assunto está sendo bastante discutido atualmente.

Concluindo, considero o texto de bom nível, interesse atual e com conteúdo adequado para um artigo de atualização.

Dulcinea Saes Parra Abdalla
Deptº de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Instituto de Química USP
Caixa Postal 20780
05508 São Paulo SP

Nombela, C., ed. - Microbial cell wall synthesis and autolysis. Proceedings of a Symposium, Madrid, July 3-6, 1984. New York, Elsevier Science Publishers, 328p., 1984.

O volume constitui os anais ("Proceedings") de um simpósio realizado sob o patrocínio da FEMS (Federation of European Microbiological Societies), realizado em Madrid de 3 a 6 de julho de 1984. O Simpósio reuniu os melhores especialistas no tema e, consequentemente, o livro contém a súmula de suas palestras.

Os temas abordados são: 1 - Modelos de crescimento e desenvolvimento celular; 2 - Biosíntese e organização dos componentes da parede celular de fungo; 3 - Autolisinas de bactérias; 4 - Autólise da parede celular de fungos e 5 - Agentes antifúngicos e a parede celular. No que se refere às bactérias a ênfase das contribuições está na autólise das paredes (papel das autolisinas) inclusive no tema sobre crescimento e desenvolvimento.

Quanto aos fungos, contemplados com 3 temas específicos, as abordagens foram mais variadas, tais como síntese e regulação de glucanos, quitina e glicoproteínas, aspectos genéticos da morfogênese, microscopia eletrônica, propriedades

imunoquímicas, etc.

O tema sobre agentes antifúngicos está relacionado ao uso de antimicóticos específicos para estudos de biossíntese de glucanos e também ao uso de protoplastos de variante de *Neurospora crassa* para detecção de compostos antifúngicos que agem a nível de parede celular. A inclusão neste item de artigos sobre inibidores de síntese de compostos de membrana afasta-se um pouco do tema central do livro.

Pela própria natureza do livro os artigos variam bastante entre si, em conteúdo e informações originais ou recentes, porém fornece, como um todo, ao pesquisador envolvido com estudos de parede celular (fungos ou bactérias), uma quantidade grande de idéias, informações e referências bibliográficas relativamente recentes.

Sonia M. de Campos Dietrich
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01051 São Paulo SP

Peberdy, J.F. & Ferenczy, L. - Fungal protoplasts: applications in biochemistry and genetics. New York, Marcel Dekker, 354p., 1985.

O volume 6 da série "Mycology" editada por Paul A. Lemke, compreende 17 capítulos que tratam da produção e da utilização dos protoplastos de fungos. A descoberta de eficientes técnicas de produção de protoplastos em fungos, ou seja, células desprovidas de parede celular, e especialmente o desenvolvimento da tecnologia de fusão celular trouxe importantes contribuições na área. Não só estas contribuições como aspectos gerais sobre produção e fusão de protoplastos são abordados no livro que é dividido em três partes. Na primeira, são enfatizados os aspectos relevantes sobre a produção de protoplastos, desde o conhecimento atual da composição da parede celular até as enzimas utilizadas na protoplastização e as principais condições que influenciam a produção de protoplastos. A segunda parte aborda o uso de protoplastos no estudo de problemas fisiológicos e bioquímicos incluindo um excelente capítulo sobre a regeneração da parede celular a partir de protoplastos em fungos. Finalmente a terceira e mais extensa parte da publicação trata da importância dos protoplastos para a genética. Ela inclui capítulos que abordam os gêneros de fungos mais bem estudados sobre o ponto de vista da produção e fusão de protoplastos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Saccharomyces*. Trata também da utilização da tecnologia da fusão de protoplastos no estudo de elementos genéticos extracromossômicos e no melhoramento genético de espécies de valor industrial. Um capítulo que é um elo entre essa tecnologia e a do DNA recombinante, aborda a transformação genética pelo uso de protoplastos de leveduras. Em síntese, é um livro escrito por especialistas de alto gabarito e muito bem coordenado. É indispensável não só para quem trabalha com protoplastos de fungos, mas também para fisiologistas, bioquímicos e geneticistas de microrganismos que têm nos protoplastos uma ferramenta cada vez mais útil na resolução dos problemas nestas áreas de pesquisa.

João Lúcio de Azevedo
Instituto de Genética ESALQ/USP
Caixa Postal 83
13400 Piracicaba SP

Pick, E., ed. - Lymphokines: a forum for immunoregulatory cell products. New York, Academic Press, vol.2, 313p., 1981. US\$ 49.50.

A descoberta da comunicação entre células imunocompetentes, através de peptídeos e receptores à semelhança do sistema endócrino, alterou de forma importante o conceito de dinâmica dos mecanismos envolvidos na resposta imunológica e

inflamatória.

O livro Lymphokines 2, editado por Edgard Pick permite apreciar detalhes dos fenômenos reguladores da maturação e função celular, mediados por estas substâncias chamadas linfocinas, e o efeito de drogas que agem sobre elas.

O volume é escrito por indivíduos experientes na área, procedentes de renomados centros de pesquisa da Europa e principalmente dos Estados Unidos da América do Norte.

Não há preocupação dos autores com uma nomenclatura nova para estes fatores aqui tratados por seus nomes originais, sempre associados as suas propriedades funcionais.

Os doze capítulos que compõem o livro versam sobre: as atividades de linfócitos e monócitos em sobrenadantes de cultura de células linfóides e mielóide humana, fator de crescimento dos linfócitos T; fatores envolvidos na formação de anticorpo in vitro; papel de radicais livres sobre a proliferação dos linfócitos, ativação dos macrófagos e supressão da resposta anticórica; papel dos fatores antígeno-específico na resposta imune, ativação dos linfócitos T por produtos da região I, receptores celulares para as linfocinas, fator de inibição da migração dos linfócitos humanos, modulação do crescimento e função dos fibroblastos, mediadores secretados por tumores, fator de necrose do tumor, valor da placa hemolítica na avaliação da produção de linfocinas e finalmente a produção de linfocinas in vivo.

Desta forma, é possível observar a abrangência deste livro. Acreditamos que a documentação apresentada e a maneira agradável como a maioria dos capítulos são escritos permite não só ao imunologista básico como ao imunologista clínico apreciar o papel importante destes "hormônios" sobre o sistema imunológico.

É necessário no entanto, ressaltar, que os autores não pretendem avaliar a ação terapêutica destas substâncias, se abstendo de discutir experiências clínicas, que ainda hoje em sua maioria são pouco conclusivas.

Apesar do livro ter sido publicado em 1981, as descrições técnicas e os achados aqui apresentados são concordes com o conhecimento atual, mantendo este volume necessário ao conhecimento da área a qualquer tempo.

Acreditamos, no entanto, que a experiência de um apanhado geral inicial, sobre as linfocinas, situando o leitor não totalmente familiar à área lhes facilitaria uma apreciação crítica mais eficiente destes fatores.

Alberto J.S. Duarte
Disciplina de Alergia e
Imunopatologia
Faculdade de Medicina USP
Caixa Postal 8091
01051 São Paulo SP

Putnam, F.W., ed. - The plasma proteins: structure, function, and genetic control.
New York, Academic Press, vol. IV, 420p., 1984.

Este livro é uma publicação composta de 6 capítulos escritos por indivíduos de diferentes centros de estudo internacionalmente conhecidos.

No primeiro capítulo, Frank W. Putnam do Departamento de Biologia da Indiana University escreve sobre o progresso no estudo das proteínas plasmáticas. Analisa a estrutura, heterogeneidade e concentração das proteínas, as deficiências hereditárias e o polimorfismo genético com a organização dos genomas nos cromossomos.

O segundo capítulo também escrito por Frank W. Putnam com título "Alpha, Beta, Gamma, Omega - The structure of the plasma proteins" trata da albumina, α -fetoproteína, tiroxina, proteínas de transporte, α -glicoproteínas com uma análise mais completa da α_1 -antitripsina que é a proteína de maior concentração deste grupo. Refere-se ainda a ceruloplasmina, haptoglobulina, vitamina D e histidina. No grupo das β -glicoproteínas tem especial destaque o estudo da transferitina,

hemopexin, β_2 -microglobulina, β_2 -glicoproteína I e a fibronectina. Analisa ainda o sistema complemento, as proteínas da coagulação e as imunoglobulinas.

O terceiro capítulo é de autoria de H. Gerhard Schwick e Heinz Haupt, ambos da West Germany. Descreve as 21 proteínas plasmáticas com função não conhecida caracterizando seu peso molecular, mobilidade eletroforética e concentração normal no soro.

O quarto capítulo sob o título de "High-Resolution Two-Dimensional Electrophoretic Mapping of Plasma Proteins", N. Leigh Anderson, Norman G. Andresson, ambos do Molecular Anatomy Program, Division of Biological and Medical Research, Argonne National Laboratory e Russel P. Tracy da Selection of Clinical Chemistry, Mayo Clinic fazem um estudo do mapeamento eletroforético das proteínas plasmáticas divididas em 4 (quatro) quadrantes.

No quinto capítulo Jacques V. Baenziger do Departamento de Patologia da Washington University School of Medicine acrescenta novas informações sobre a glicosilação enzimática das proteínas plasmáticas.

O sexto capítulo escrito por Russel F. Doolittle do Departamento de Química da University of California at San Diego, sob o título "Evolution of the Vertebrate Plasma Proteins" o autor considera a origem e evolução das proteínas plasmáticas com especial atenção para as mais importantes, isto é, a albumina, transferritina, fibrinogênio, α_1 -antitripsina, haptoglobina e as lipoproteínas, todas intensamente estudadas nos mamíferos.

No apêndice encontramos a sequência dos aminoácidos das proteínas plasmáticas.

Maria Roseli Callado
Banco de Sangue
Hospital do Servidor
Estadual
Público
Rua Pedro de Toledo, 1800
04039 São Paulo SP

Relatório de viagem para participação no 49 Simpósio Internacional de Ecologia de Microrganismos.

Período da viagem - 22/08 a 07/09/86

Local - Ljubljana - Yugoslavia

Bolsas de Auxílio - CNPq - Taxa de Inscrição e estadia
FAPESP - 30% passagem Rio-Paris-Zurique- São Paulo, total passagem
Paris-Zagreb-Zurique, Varig - 70% passagem Rio-Paris-Zurique-São Paulo.

Finalidade - Apresentação do "Poster" "Studies on the Extra-Human Ecology of Vibrios"; participação da reunião do ICOME (International Committee on Microbial Ecology) como representante da Sociedade Brasileira de Microbiologia - SBM, visando candidatar o Brasil ao 59 Simpósio Internacional de Ecologia de Microrganismos (59 ISME).

Atividades pós Congresso - Contacto com cientistas para discussão de trabalhos a serem realizados em conjunto.

Atividades realizadas - 1) Apresentação do "poster"; 2) Apresentação do Brasil como candidato à realização, em São Paulo, do 59 Simpósio Internacional de Ecologia de Microrganismos (59 ISME), em 1989.

Em reunião realizada em 27 de agosto de 1986, das 13:00 às 15:00h, além de outros assuntos de interesse do ICOME, foi apresentada a candidatura do Brasil, para organizar o 59 Simpósio ISME em 1989, e, da Espanha e Nigéria para o 69 ISME, em 1992.

O Brasil distribuiu a cada representante dos países presentes, bem como ao Presidente e Secretário do ICOME, as sacolas promocionais da EMBRATUR "Flight to

Brazil" contendo folhetos sobre os principais pontos turísticos do país.

Informamos que em São Paulo, dispomos não apenas de locais adequados para a organização de eventos deste porte mas também de toda e infraestrutura necessária.

Projetamos "slides" mostrando os principais pontos turísticos das várias unidades da Federação, informando sobre as possibilidades de "tours" pré ou pós Simpósio.

Foi questionado por um dos representantes se o Brasil teria condições de oferecer apoio financeiro a pesquisadores de países em desenvolvimento para participação no evento. Informamos que já havíamos solicitado e recebido verba para bolsas para vários pesquisadores sul americanos e africanos permitindo sua participação em eventos nos quais havíamos colaborado na organização.

O representante da África do Sul informou que o Brasil atualmente está negando visto de entrada para pessoas daquele país e que, da delegação de 24 pessoas que iriam participar da "International Conference on Water Pollution Research and Control" que foi realizada no Rio de Janeiro, de 17-22/8/86, poucas tiveram seu visto de entrada concedido. Informamos que o Brasil atualmente tem uma grande abertura para todos os países, já mantém contactos e colaboração também com os países socialistas e que acreditávamos que a situação com a África do Sul foi uma exceção que seria solucionada, portanto acreditávamos que, em 1989 não ocorreriam problemas similares.

O presidente e Secretário do ICOME manifestaram-se solidários ao representante da África do Sul comentando que a ciência não deveria ser prejudicada por problemas políticos.

Como o Japão já havia apresentado sua candidatura, na 1ª reunião do dia 24/8/86, da qual não pudemos participar devido a atraso do vôo Paris-Zagreb, os representantes do Brasil e Japão foram convidados a deixar a reunião para que os demais participantes pudessem votar no país que deveria hospedar o 5º ISME.

Após a votação fomos convocados novamente para a reunião para tomar ciência do resultado.

Fomos informados que o Japão foi o vencedor, embora por pequena diferença de votos.

Enfatizamos a importância da realização do 5º ISME no Brasil pois há uma premente necessidade do desenvolvimento das áreas de Ecologia de microrganismos e Microbiologia ambiental, não apenas em nosso país mas em toda América Latina e Caribe. Mostramos que a importância destas duas áreas da ciência vêm sendo cada vez mais evidente não apenas do ponto de vista dos conhecimentos básicos e fundamentais da Ecologia de microrganismos, no estudo de interação entre estes e o meio ambiente com suas características bióticas e abióticas, no estudo de ambiente extremos, nos processos biogeoquímicos, na agricultura (principalmente na fertilização de solos e controle biológico da peste e patógenos) no controle da poluição ambiental, no controle dos processos de tratamento de esgotos e resíduos sólidos mas também na Biotecnologia, pois foi muito discutida e enfatizada durante o Simpósio a necessidade do conhecimento da Ecologia de microrganismos na otimização de processos desenvolvidos na Biotecnologia.

Comentamos sobre a grande lacuna de conhecimentos existentes na área de Ecologia de microrganismos nos países da América Latina e Caribe e a importância das Sociedades Científicas no seu papel de estimular o desenvolvimento dos recursos humanos na sua área específica. Informamos que a SBM já estabeleceu um convênio de cooperação internacional com o Chile e está em vias de concretizar outro com Peru e Argentina visando intercâmbio de conhecimentos e atividades conjuntas de pesquisa.

Tendo em vista a alta qualidade dos trabalhos apresentados (cerca de 440, incluindo conferências, trabalhos com apresentação oral e "posters") e do alto gabarito dos pesquisadores participantes do evento, discutimos a importância de expor os pesquisadores e estudantes nacionais a evento similar visando estimular o desenvolvimento da pesquisa nessa área do conhecimento.

Demonstramos a competência adquirida pela SBM na organização de eventos internacionais pois esta Sociedade já organizou, em 1973 a GIAM IV (4º Conferência sobre Impactos Globais da Microbiologia Aplicada, e, em 1983, o 9º Congresso Latinoamericano de Microbiologia, ambos os eventos realizados em São Paulo, no Anhembi, sendo que, no 1º houve a participação de mais de 2.500 pessoas, e, no segundo, mais de 1.200 pessoas.

Consultamos a Presidência do ICOME sobre a possibilidade de o Brasil realizar o 6º ISME em 1992.

Fomos informados que, como Espanha e Nigéria haviam também se candidatado e, como não havia informação suficiente sobre o local, infra-estrutura e orçamento prévio a decisão só poderia ser tomada posteriormente.

As representantes da Nova Zelândia e Finlândia e o representante da Sociedade Biogeoquímica (USA) nos procuraram em particular para demonstrar seu apoio.

Após a reunião a Dra. Rita Colwell, Presidente da Associação Americana de Microbiologia informou-nos, extra-oficialmente, que o Japão também teria maiores chances de sair vitorioso na sua candidatura ao Congresso Internacional de Bacteriologia da IUMS (International Union of Microbiological Societies) pois o governo japonês está oferecendo todos os recursos institucionais e financeiros para ciência e tecnologia e para a realização de eventos, portanto a ICOME e a IUMS não poderiam perder esta oportunidade. Ela incentivou, porém a SBM a manter sua candidatura para o 6º ISME em 1992 e acredita que teremos grandes chances para a realização do Congresso Internacional de Bacteriologia e Micologia da IUMS, em 1994.

Contactos posteriores ao Simpósio foram mantidos com o Prof. Dr. R. Guerrero, Deptº de Microbiologia, Universidade de Barcelona, Espanha; Prof. Dra. R. Colwell - Deptº de Microbiologia, Universidade de Maryland, USA; Dr. W.O.K. Grabow - National Institute of Water Research - África do Sul; Profa. Dra. Renate Walter - Academia de Medicina "Carl Gustav Carus", Dresden R.D.A.

Finalidade - Realização de trabalhos conjuntos e possível visita para conhecimento de técnicas usadas em seus laboratórios.

Agradecemos ao Deptº de Microbiologia e à Universidade de São Paulo, pela permissão para afastamento, para participação no evento, à FAPESP, CNPq e VARIG, pelo fornecimento de recursos.

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

Sumários Correntes Brasileiros. Ciências Exatas e Biológicas, 1(7):1-58, 1986.

Os Sumários Correntes Brasileiros objetivam a divulgação, em âmbito nacional, dos sumários dos periódicos científicos e técnicos editados no Brasil.

Os Sumários Correntes Brasileiros são editados mensalmente em duas séries: Ciências Exatas e Biológicas (incluindo Ciências Exatas e da Terra, Ciências Biológicas, Engenharias, Ciências da Saúde, Ciências Agrárias) e Ciências Sociais e Humanas (incluindo Ciências Sociais Aplicadas, Ciências Humanas, Linguística, Letras e Artes). Os periódicos multidisciplinares são incluídos em ambas as séries.

O conteúdo dos Sumários Correntes Brasileiros está organizado em ordem alfabética, por áreas do conhecimento, de acordo com a Tabela de Classificação elaborada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Em cada área, o leitor encontrará os periódicos dispostos em ordem alfabética de título.

Sumários Correntes Brasileiros; Ciências Exatas e Biológicas -
Publicação mensal do Instituto Brasileiro de Informação em Ciência e Tecnologia - IBICT.