

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 18 Número 3 Jul. Set. 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) e pico (p), ao invés de milímetro ($m\mu$) 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 milímetro ($m\mu$); e Angstroms (Å ; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem e subcapítulos devem ser colocados junto à margem esquerda do manuscrito, incluídos essencialmente pela ordem: Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussões, 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 arábico e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

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

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

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



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

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

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

Diretor Executivo Flavio 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
Flavio 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
Walderez 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 agrupar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes.
Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 18 JULHO-SETEMBRO 1987 NÚMERO 3
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 18(3)

		CONTEÚDO	CONTENTS
Jerez, J.A.; Candeias, J.A.N.; Rácz, M.L.; Durigon, E.L.; & Ribeiro, L.C.	201	Evidenciação de rotavírus através de ensaio imunoenzimático em fezes diarréicas de bezerros	<i>Detection of rotavirus by ELISA in diarrheal faeces of neonatal calves</i>
Durigon, E.L.; Angelo, M.J. de O.; Jerez, J.A.; Tanaka, H.; & Hagiwara, M.K.	205	Comparação entre as reações de hemaglutinação (HA), isolamento do vírus em culturas celulares (CC), imunoeletroosmoforesse (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME), para o diagnóstico etiológico da parvovirose canina	<i>Comparison of hemagglutination test, isolation in tissue culture, immunoelctroosmophoresis and immunoelectronmicroscopy for diagnosis of canine parvovirus infection</i>
Souza, A.M. de; & Romero, C.H.	211	Efeito dos vírus da leucose linfóide e da doença infecciosa sobre a vacinação contra a doença de Newcastle	<i>Effect of the lymphoid leukosis virus and infectious bursal diseases virus over the vaccination against Newcastle disease virus</i>
Magalhães, M.	219	Resistência cromossômica à penicilina em <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<i>Chromossomic resistance to penicillin in Neisseria gonorrhoeae</i>
Hipólito, M.; Mavridis S.C.; Baldassi, L.; Moulin, A.A.P.; & Barbosa, M.L.;	224	<i>Aeromonas hydrophila</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de caso de estomatite em <i>Bothrops alternatus</i> (Serpente, Viperidae)	<i>Aeromonas hydrophila and Pseudomonas aeruginosa isolated from stomatitis in Bothrops alternatus (Serpente, Viperidae)</i>
Magalhães, M.	229	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase no Recife, Brasil	<i>Penicillinase producing Neisseria gonorrhoeae in Recife, Brazil</i>
Freitas, A.C. de Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D.	235	Ocorrência de <i>Versinia</i> sp. em redutos aquáticos naturais, na cidade do Rio de Janeiro	<i>Occurrence of <i>Versinia</i> sp. in natural aquatic resources of Rio de Janeiro city</i>
Pavan, M. de F.B.; Manizuka, E.M.; Martinez, M.B.	243	<i>Campylobacter</i> termófilo em fezes de crianças com diarréia: estudo com controles	<i>Thermophilic Campylobacter in stools of children with diarrhea: study with controls</i>

Dias, J.M.C. de S.; Facciotti, M.C.R.; & Schmidell, W.	249	Influência de micronutrientes e de extrato de levedura no crescimento de <i>Azospirillum brasiliense</i> em incubador rotativo	Influence of micronutrients and yeast extract on <i>Azospirillum brasiliense</i> growth in rotary shaker
Corrêa, B.; Purchio, A.; Paula, C.R.; & Gambale, W.	258	Avaliação da eficácia do método de fluorescência no estudo de viabilidade de amostras de <i>Candida</i> <i>albicans</i>	Evaluation of a fluorescent method in the study of the viability of <i>Candida</i> <i>albicans</i> strains
Abrahão Neto, J.; & Cunha, C. de A.	264	Método rápido para a triagem de fungos amilolíticos e seus mutantes	Simplified method for amylolytic fungi screening
Carvalho, A. de; Rosim, R.C.; & Molinari, R.;	269	Estudo da nutrição e produção de substâncias que absorvem no ultravioleta por <i>Aspergillus ochraceus</i>	Production of UV light absorbing substances by <i>Aspergillus ochraceus</i> in relation to media composition
Dias, D.; & Kammelmeir, C.	276	Ocorrência da galactose oxidase em <i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>	Galactose oxidase occurrence in <i>Fusarium</i> <i>graminearum</i>
Almeida, P.F. de; & Serrano, A. de M.	279	Ocorrência de <i>Campylobacter fetus</i> subespécie <i>jejuni</i> em carcaças de frangos e suínos	Occurrence of <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> in pig and poultry carcasses
Eira, A.F. da; & Salles Fº, S.L.M.	284	Análise de metano por combustão em arco-voltáico	Methane determination by combustion under electrical discharge
Eira, A.F. da; & Salles Fº, S.L.M.	288	Coleta, armazenamento e volumetria de biogás em reatores anaeróbios de laboratório	Collection, storage and volume measurement of biogas laboratory anaerobic reactors
Informação Técnico-Científica SBM	292		

EVIDENCIAMENTO DE ROTAVÍRUS ATRAVÉS DE ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO EM FEZES DIARRÉICAS DE BEZERROS

José Antonio Jerez
José Alberto Neves Candeias
Maria Lúcia Rácz
Edison Luiz Durigon

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

& Luiz Conrado Ribeiro

Seção de Virologia Animal
Instituto Biológico de São Paulo
Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252
04014 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Em 120 amostras fecais obtidas de bezerros, machos e fêmeas de diversas raças, de até 30 dias de idade, com diarréia e colhidas em diversas fazendas de criação de gado bovino leiteiro localizadas em 14 Municípios do Estado de São Paulo, constatou-se que 35 (29%) foram positivas ao ensaio imunoenzimático (ELISA) para a pesquisa de rotavírus, razão pela qual esses agentes devem ser considerados na etiologia das diarréias dos bezerros novos, em diversas regiões do Estado de São Paulo.

Summary

Detection of rotavirus by ELISA in diarrheal faeces of neonatal calves

From 120 fecal samples of neonatal calves with diarrhea, including males and females, less than four weeks of age, from different races, and harvested in various dairy cattle farms in 14 areas of São Paulo State, Brazil, 35 (29%) were positive for rotavirus by Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay - ELISA. In conclusion, the rotaviruses must be recognized as an important agent in the aetiology of diarrhea in neonatal calves, in different areas of São Paulo State, Brazil.

Introdução

Em trabalho anterior foi verificado que 172 (48%) dos 353 animais estudados apresentavam anticorpos anti-rotavírus, resultado sugestivo de uma possível participação dos rotavírus na etiologia das diarréias de bezerros, em algumas regiões do Estado de São Paulo.

Na presente investigação procurou-se evidenciar, através de ensaio imunoenzimático (ELISA), a presença de rotavírus a partir de material fecal de bezerros com diarréia.

Material e Métodos

Fezes - As amostras de fezes, em número de 120, foram obtidas a partir de bezerros, incluindo animais do sexo masculino e feminino, de até 30 dias de idade, com quadro clínico de diarréia, em diversas fazendas de criação de gado bovino leiteiro localizadas em 14 Municípios do Estado de São Paulo.

As fezes eram colhidas em frascos esterilizados de boca larga e mantidas em condições de refrigeração até que chegassem ao laboratório.

Preparo do material fecal - As fezes eram diluídas na proporção de 1:10 em tampão TRIS 0,1M com pH 7,3. Algumas pérolas de vidro eram colocadas nos tubos de ensaio e, em seguida, procedia-se à agitação em "mixer".

A suspensão fecal permanecia, aproximadamente, 30 minutos à temperatura ambiente, com duas ou três agitações durante esse período, após o qual o material era centrifugado a 10.000rpm durante 30 minutos. O sobrenadante era tratado com igual volume de Freon T.F. (Triclorotrifluoretano). Após a homogeneização, todo material era centrifugado a 3.000rpm durante 15 minutos. O sobrenadante desta segunda centrifugação era utilizado para a pesquisa de antígeno viral, através de ensaio imunoenzimático.

Ensaio imunoenzimático - Utilizou-se os procedimentos descritos por Voller & col. (12) para a técnica de "duplo sanduíche", sendo os componentes fornecidos pela Organização Mundial da Saúde, através de "kit" "ELISA-test", no qual os soros hiperimunes são preparados a partir de amostra SA₁₁ de rotavírus. Cada uma das depressões da microscopia (Nunc, Dinamarca) recebia 100µl de soro hiperimune de coelho anti-rotavírus, em diluição a 1:100 em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,8; a microplaca era coberta e incubada a 4°C durante uma noite. O conteúdo das depressões era desprezado e as depressões lavadas seis vezes com PBS/T (tampão fosfato-salina com 0,1% v/v de Tween-20); a seguir distribuía-se 75µl de PBS/T/EDTA (tampão fosfato-salina com 0,1% v/v de Tween-20 e 0,1M de EDTA com pH 7,2) em todas as depressões, exceto às destinadas aos controles, e em pares de depressões distribuía-se 25µl de cada suspensão de fezes a ser analisada (diluição final 1:40). Em cada microplaca incluía-se 3 amostras de material fecal que acompanham o "kit" para controle de qualidade (os resultados dessas amostras devem ser enviados para a "W.H.O. Collaborating Centre for Reference & Research on Rotaviruses" Birmingham, U.K.). As microplacas eram cobertas e incubadas a 37°C durante duas horas, o conteúdo era desprezado e as depressões lavadas mais seis vezes com PBS/T. Distribuía-se 100µl de soro hiperimune de cobaio anti-rotavírus em diluição 1:100 em PBS/T/BSA (tampão fosfato-salina com 0,1% de Tween-20 e 1% de albumina em todas as depressões, exceto as destinadas aos controles, sendo a microplaca coberta e incubada durante duas horas e 30 minutos à 37°C. O conteúdo era desprezado e as depressões lavadas mais seis vezes com PBS/T. A seguir 100µl de conjugado (IgG de cabra anti-IgG de cobaio, conjugado à fosfatase alcalina) diluído à 1:200 em PBS/T/BSA eram distribuídos em todas as depressões, exceto às destinadas ao controle do substrato, sendo a microplaca coberta e incubada a 37°C durante 30 minutos. O conteúdo era desprezado e as depressões lavadas mais seis vezes com PBS/T. Todas as depressões recebiam 100µl de substrato de fosfatase alcalina (p-nitrofenil-fosfato diluído em solução de 10% de dietanolamina em água destilada, adicionada de 0,01% de MgCl₂.6H₂O e pH ajustado para 9,8 com ácido clorídrico concentrado; concentração final=1mg de p-nitrofenilfosfato/mililitro de meio); a microplaca era coberta e incubada a 37°C durante, aproximadamente, 20 minutos; para se interromper a reação, adicionava-se, a cada depressão, 50µl de hidróxido de sódio 3M. Procedia-se à leitura espectrofotométrica com comprimento de onda igual a 405nm, usando-se com "branco" as depressões controle do substrato. Eram consideradas positivas as amostras cujas absorbâncias medidas eram maiores de que 0,1 e, negativas, aquelas cujas absorbâncias eram menores ou iguais a 0,1.

As amostras positivas eram confirmadas através do "bloqueio", utilizando-se soro "pré-imune" e hiper-imune de coelho, fornecido pronto para uso, diluído em PBS/T/EDTA.

Resultados e Discussão

Na presente investigação verificou-se os rotavírus estão presentes em fezes diarréicas de bezerros novos, uma vez que em 120 amostras de fezes analisadas, 35 (29%) foram positivas ao ensaio imunoenzimático para a pesquisa de rotavírus (Tabela 1).

A participação dos rotavírus na etiologia das diarréias dos bezerros vem ocupando lugar de destaque, quer isoladamente, quer em infecções mistas (1, 8), inclusive com grandes prejuízos econômicos (7).

O diagnóstico das infecções por rotavírus pode ser realizado por imunofluorescência (2, 13), imunomicroscopia eletrônica (2, 13), fixação do complemento (5, 11, 13), precipitação em gel de ágar (10, 13), ensaios imunoenzimáticos (4, 5), imunoeletroforese (3, 5) ou hemaglutinação por imunoaderência (9), que são reações que se processam com o antígeno comum aos rotavírus, localizado ao nível do capsídeo interno (6, 11, 13). Entre todas essas reações, os ensaios imunoenzimáticos e a imunomicroscopia eletrônica são as que apresentam maiores vantagens (5), razão pela qual se escolheu o ensaio imunoenzimático para a presente investigação; a opção de utilização de "kit" fornecido pela Organização Mundial da Saúde deve-se ao fato ao mesmo oferecer total confiabilidade quanto aos resultados obtidos, uma vez que dispõe de amostras-controles devidamente testadas pelo Laboratório de Referência, em Birmingham, Inglaterra.

Entretanto, o diagnóstico da infecção por rotavírus através de ensaio imunoenzimático, ou das técnicas anteriormente citadas, não nos fornece nenhum dado acerca de possíveis variações antigênicas das amostras evidenciadas, razão pela qual achamos conveniente que se continue a estudar os rotavírus bovinos em nosso país, principalmente nos aspectos que tangem à imunoprofilaxia da doença.

Agradecimentos

Ao Dr. Antonio de Oliveira Lobão do Instituto de Zootecnia, ao Prof. Dr. Aramis Augusto Pinto da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP e ao Dr. Paulo Athaide da Associação Brasileira de Criadores, pelo auxílio na colheita de amostras.

Referências Bibliográficas

1. Bachmann, P.A. - Viral gastroenteritis in calves: causes and prevention. *Med. Vet. Pract.*, 64:559-565, 1983.
2. Bridger, J.C. & Woode, G.N. - Neonatal calf diarrhoea: identification of a reovirus-like (rotavirus) agent in faeces by immunofluorescence and immune electron microscopy. *Br. Vet. J.*, 131:528-535, 1975.
3. Candeias, J.A.N.; Rosenburg, C.P. & Rácz, M.L. - Identificação por contraimunoeletroforese de rotavírus em casos de diarréia infantil. *Rev. Saúde Pública*, 12:99-103, 1978.

Tabela 1 - Distribuição das amostras de fezes de bezerros, machos e fêmeas com até 30 dias de idade, que apresentavam quadro clínico de diarréia, segundo os Municípios onde se encontravam as propriedades de criação visitadas e os resultados do ensaio imunoenzimático, São Paulo, 1985

Município	Nº amostras examinadas	Nº amostras positivas ao ELISA
Ámparo	5	-
Batatais	6	3
Bragança Paulista	5	1
Campinas	28	9
Cotia	5	-
Itapetininga	8	4
Itatiba	5	-
Jacareí	2	1
Lins	25	5
Parapuã	2	-
Pirassununga	1	-
São Carlos	17	7
Sorocaba	10	5
Tietê	1	-
Total	120	35

4. Ellens, D.J. & Leeuw, P.W. - Enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of rotavirus infections in calves. *J. Clin. Microbiol.*, 6:530-532, 1977.
5. Ellens, D.J.; Leeuw, P.W.; Straver, P.J. & Balken, J.A.M. - Comparison of five diagnostic methods for the detection of rotavirus antigens in calf faeces. *Med. Microbiol. Immunol.*, 166:157-163, 1978.
6. Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H.; Woode, G.N.; Bridger, J.C. & Derrick, J.M. - Relation between viruses from acute gastroenteritis of children and newborn calves. *Lancet*, 2:61-63, 1974.
7. House, J.A. - Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173:573-576, 1978.
8. Krogh, H.V. & Henriksen, S.A. - Bovine cryptosporidiosis in Denmark. 2 - Cryptosporidia associated with neonatal calf diarrhea. *Nord. Vet. Med.*, 37:42-47, 1985.
9. Matsuno, S. & Nagayoshi, S. - Quantitative estimation of infantile gastroenteritis virus antigens in stools by immune adherence hemagglutination test. *J. Clin. Microbiol.*, 7:310-311, 1978.
10. Sharp, J.M. & Littlejohns, I.R. - Detection of rotavirus infection by immunodiffusion. *Vet. Microbiol.*, 6:31-39, 1981.
11. Thouless, M.E.; Bryden, A.S.; Flewett, T.H.; Woode, G.N.; Bridger, J.C.; Snodgrass, D.R. & Herring, J.A. - Serological relationship between rotaviruses from different species as studied by complement fixation and neutralization. *Arch. Virol.*, 53:287-294, 1977.
12. Voller, A.; Bartlett, A.; Bidwill, D.E.; Clark, M.F. & Adams, A.N. - The detection of viruses by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J. Gen. Virol.*, 33:165-176, 1976.
13. Woode, G.N.; Bridger, J.C.; Jones, J.M.; Flewett, T.H.; Bryden, A.S.; Davies, H.A. & White, G.B.B. - Morphological and antigenic relationship between viruses (rotaviruses) from acute gastroenteritis of children, calves, piglets, mice and foals. *Infect. Immun.*, 14:804-810, 1976.

COMPARAÇÃO ENTRE AS REAÇÕES DE HEMAGLUTINACÃO (HA), ISOLAMENTO DO VÍRUS EM CULTURAS CELULARES (CC), IMUNOELETROSMOFORESE (IEOF) E IMUNOMICROSCOPIA ELETRÔNICA (IME), PARA O DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DA PARVOVIROSE CANINA

Edison Luiz Durigon
Maria José de Oliveira Ángelo
José Antonio Jerez

Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
01051 São Paulo SP, Brasil

Hatune Tanaka
Seção de Microscopia Eletrônica
Divisão de Biologia Médica
Instituto Adolfo Lutz
Caixa Postal 7027
01051 São Paulo SP, Brasil

& Mitika Kuribayashi Hagiwara
Deptº de Clínica
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP
Cidade Universitária
05340 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Comparou-se as reações de hemaglutinação (HA), isolamento do vírus em culturas celulares (CC), imunoelétronsmoforesse (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME), no diagnóstico etiológico da parvovirose canina. Utilizou-se 34 amostras de fezes de cães com gastroenterite hemorrágica com títulos hemaglutinantes variando de menor que 4 à 4096, e fez-se a correlação dos resultados dessas amostras com as que possuíam títulos hemaglutinantes altos ($HA \geq 64$). Observou-se uma alta concordância entre os quatro métodos nas amostras com títulos hemaglutinantes maiores ou iguais a 64, e uma baixa concordância dos métodos nas amostras com títulos hemaglutinantes baixos. A análise dos dados obtidos, fez-nos concluir serem os quatro métodos de grande utilidade para o diagnóstico da parvovirose canina, sendo aconselhável, porém, o uso de, ao menos, dois métodos, a fim de se evitar resultados inespecíficos.

Summary

Comparison of hemagglutination test, isolation in tissue culture, immunoelctroosmophoresis and immunoelectronmicroscopy for diagnosis of canine parvovirus infection

Canine fecal samples were analyzed by hemagglutination (HA) test, virus isolation in tissue culture (TC), immunoelctroosmophoresis (IEOP) and immunoelectronmicroscopy (IEM), in the etiological

diagnosis of canine parvovirus infection. The data were compared with results obtained through of samples with hemagglutination titers from <4 to 4096 with samples from of the group HA \geq 64. The highest correlation was observed among four test with fecal samples from of the group HA \geq 64, and lower correlation was obtained from fecal sample for all of the group (HA<4 to 4096). The studies indicated the usefulness of the four test for the diagnosis assays for canine parvovirus infection, although it is recommended the application of at least two of the methods to avoid inespecific results.

Introdução

A parvovirose canina é uma doença infecciosa caracterizada principalmente por enterite e leucopenia, culminando com o óbito, nos casos mais graves. A partir de 1978, epizootias desta doença passaram a ser observadas, simultaneamente, em várias partes do mundo (3, 7, 9). No Brasil, embora casos de enterite hemorrágica tenham sido observados esporadicamente a partir de 1979, somente em 1980 é que houve a disseminação da doença entre a população canina (2, 10).

Devido ao fato do parvovírus canino apresentar a propriedade de aglutinar hemácias de suínos e de macacos rhesus à temperatura de 4°C e 18°C, a maioria dos pesquisadores têm utilizado a reação de hemagglutinação como método de rotina no diagnóstico rápido da parvovirose canina (5, 9, 12, 16, 19).

O isolamento e a caracterização do vírus, em cultivos celulares primários e de linhagens, têm sido utilizados por vários pesquisadores para o diagnóstico da parvovirose canina (2, 8, 9, 12).

A imunoelétroforese, apesar de ser uma reação que necessite de grandes quantidades de抗原 para a visualização das linhas de precipitação, também tem sido usada no diagnóstico de enterite viral (6, 15). Na parvovirose canina, a imunoelétroforese foi utilizada apenas por Schwers & col. (18) e por Klingeborn e Moreno-Lopez (13) como método rápido de diagnóstico.

A microscopia eletrônica tem auxiliado no diagnóstico da parvovirose canina, através da visualização de parvovírus diretamente em materiais clínicos (8, 9). A IME, por sua vez, possibilita um diagnóstico rápido e seguro desta infecção viral, pois além de demonstrar a presença do agente etiológico, permite a sua identificação através da utilização de um antíssero específico (1, 4, 20).

No presente trabalho, realizamos um estudo comparativo entre as reações de hemagglutinação (HA), isolamento do vírus em culturas celulares (CC), imunoelétroforese (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME). Além disso, foi traçado um paralelismo entre as amostras com títulos hemagglutinantes maiores ou iguais à 64 e as amostras com títulos hemagglutinantes variando de menor que 4 à 4.096, uma vez que vários autores (5, 14, 16, 19), classificam os títulos hemagglutinantes menores que 64 como sendo inespecíficos para parvovírus canino.

Material e Métodos

1. Suspensão fecal - Foram selecionadas 34 amostras de fezes de cães colhidas durante a epizootia de parvovirose canina ocorrida na grande São Paulo, em 1980. Estas amostras, previamente submetidas à clarificação (2), foram utilizadas na reação de hemagglutinação e em isolamento do vírus em culturas celulares. Cerca de 10ml de cada amostra da suspensão fecal foram submetidos à concentração durante 90 minutos a 200.000g em ultracentrifuga, refrigerada a 4°C. Após a centrifugação, o sedimento foi resuspenso em 0,2ml de PBS e utilizados para as reações de imunoelétroforese e imunomicroscopia eletrônica.

2. Soro hiperimune - Foi utilizado o soro de cavalo antiparvovírus felino (feliserin), produzido pelo laboratório Behringwerke da Alemanha com diluição ótima de trabalho de 1:16 para imunoelétroforese e 1:64 para imunomicroscopia eletrônica.

3. Reação de hemaglutinação (HA) - A reação de hemaglutinação das suspensões fecais foi executada em microténica, utilizando hemácias de suínos diluídas à 1% de acordo com a técnica descrita por Angelo (2).

4. Isolamento do vírus em culturas celulares (CC) - O isolamento do vírus em culturas celulares das suspensões fecais, foi realizado em culturas primárias de rim canino, rim felino e em linhagens celulares estabelecidas (MA104 e células vero), conforme descrito em trabalho anterior (2).

5. Reação de imunoelletroforese (IEOF) - A reação de imunoelletroforese foi realizada segundo Schwers & col. (18), com as seguintes modificações técnicas: lâminas de vidro, medindo 12,0 x 9,0cm, pré revestidas com ágar a 1% em água e recobertas com 17ml de agarose a 1% em tampão tris-acetato ($\mu=0,025\mu$, pH 8,6).

Após a solidificação da agarose, duas fileiras paralelas de orifícios de 4mm de diâmetro foram feitas, mantendo-se 10mm de distância entre os orifícios. As lâminas foram colocadas em cubas de eletroforese, contendo tampão tris-acetato ($\mu=0,05\mu$, pH 8,6). As amostras de fezes a serem testadas foram colocadas nos orifícios, voltadas para o polo negativo, e o antisoro diluído a 1/16, foi colocado nos orifícios voltados para o polo positivo. A seguir aplicou-se uma corrente de 150 volts durante 90 minutos.

Após a corrida eletroforética, as lâminas foram lavadas durante 24 horas em solução fisiológica e tratadas com ácido tânico a 1%, em solução aquosa, por 30 minutos.

6. Reação de imunomicroscopia eletrônica (IME) - Uma parte da suspensão fecal foi adicionada a igual volume de antisoro diluído a 1/64, em tubo de ensaio e incubada à temperatura ambiente por 1 hora. Uma gota da mistura foi depositada sobre uma grade de cobre de 300 mesh, previamente revestida com filme de formvar e carvão sendo o excesso retirado com papel de filtro. Após a secagem, a grade foi submetida a coloração negativa com uma gota de silicotungstato de sódio a 1% (pH 7,2). Depois de seca, foi observada em um microscópio eletrônico Philips EM400T, operando a 80Kv.

Resultados

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos nas 4 técnicas estudadas. Observa-se que, das 34 amostras, 32 foram positivas por hemaglutinação (94,1%) com títulos que variaram desde 4 até 4.096 e duas foram negativas (HA<4), apresentando resultados também negativos nos demais métodos estudados. Da totalidade das amostras, 20 foram positivas no isolamento do vírus em culturas celulares (58,8%); 11 o foram na imunoelletroforese (32,3%) e 17 foram positivas na imunomicroscopia eletrônica (50,0%).

As Tabelas 2, 3, 4, mostram a comparação entre as 4 técnicas empregadas, fazendo-se um paralelo entre os resultados obtidos das amostras com títulos iguais ou superiores à 64 e da totalidade das amostras, cujos títulos hemaglutinantes variaram de menor que 4 à 4096.

Discussão e Conclusão

A comparação entre os quatro métodos utilizados neste trabalho demonstrou ser a reação de hemaglutinação mais eficiente do que as outras técnicas adotadas (Tabela 1). Este método, entretanto, além de exigir a constante obtenção de hemácias frescas de suínos ou de macacos Rhesus para a sua realização, tem a desvantagem de apresentar resultados inespecíficos para parvovírus canino, em amostras com títulos hemaglutinantes baixos (5, 14, 16, 19).

No presente trabalho, quando analisamos os resultados da reação de hemaglutinação na totalidade das amostras (HA<4 à 4096) e nas amostras com títulos de HA \geq 64, verificamos que a porcentagem de concordância entre a hemaglutinação e a

Tabela 1 - Resultados das reações de hemaglutinação (HA), isolamento de vírus em culturas celulares (CC), imunoelétroforese (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME), utilizando 34 amostras de fezes de cães. % de positivos 32/34(94,1%) 20/34(58,8%) 11/34(32,3%) 17/34(50,0%)

Suspensão fecal	HA	CC	IEOF	IME
1	<4	(-)	(-)	(-)
2	<4	(-)	(-)	(-)
3	4	(-)	(-)	(-)
4	4	(-)	(+)	(+)
5	4	(-)	(-)	(+)
6	4	(+)	(-)	(-)
7	4	(-)	(-)	(+)
8	4	(-)	(-)	(-)
9	8	(+)	(-)	(-)
10	8	(-)	(-)	(-)
11	8	(+)	(-)	(-)
12	8	(+)	(-)	(-)
13	8	(-)	(-)	(+)
14	8	(+)	(-)	(-)
15	16	(+)	(-)	(-)
16	16	(+)	(-)	(-)
17	16	(+)	(-)	(+)
18	16	(+)	(+)	(+)
19	16	(+)	(-)	(-)
20	32	(-)	(+)	(+)
21	32	(-)	(-)	(-)
22	32	(-)	(-)	(-)
23	64	(+)	(-)	(+)
24	64	(-)	(-)	(+)
25	64	(+)	(+)	(+)
26	128	(+)	(-)	(-)
27	128	(+)	(+)	(+)
28	128	(+)	(+)	(+)
29	128	(+)	(+)	(+)
30	256	(-)	(+)	(+)
31	512	(+)	(+)	(+)
32	512	(+)	(-)	(-)
33	512	(+)	(+)	(+)
34	4096	(+)	(+)	(+)

Tabela 2 - Comparação entre a reação de hemaglutinação (HA) e as técnicas de isolamento do vírus em culturas celulares (CC), imunoelétroforese (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME), utilizando as 34 amostras com títulos de HA<4 à 4096 e as 12 amostras com títulos de HA≥64.

Símbolos: A = Amostras com títulos de HA<4 à 4096; B = Amostras com títulos de HA≥64

Resultados	CC		IEOF		IME	
	A	B	A	B	A	B
Concordantes						
Pos/Pos	20	10	11	08	17	10
Neg/Neg	02	00	02	00	02	00
Discordantes						
Pos/Neg	12	02	21	04	15	02
Neg/Pos	00	00	00	00	00	00
% de concordantes	(64,7)	(83,3)	(38,2)	(66,7)	(55,9)	(83,3)

Tabela 3 - Comparação entre a reação de imunoelétroforese (IEOF) e as técnicas de isolamento de vírus em culturas celulares (CC) e imunomicroscopia eletrônica (IME), utilizando as 34 amostras com títulos de HA<4 à 4096 e as 12 amostras com títulos de HA≥64.

Símbolos: A = Amostras com títulos de HA<4 à 4096; B = Amostras com títulos de HA≥64

Resultados	CC		IME	
	A	B	A	B
Concordantes				
Pos/Pos	08	07	11	08
Neg/Neg	11	01	17	02
Discordantes				
Pos/Neg	03	01	00	00
Neg/Pos	12	03	06	02
% de concordantes	(55,8%)	(66,7%)	(82,3%)	(83,3%)

Tabela 4 - Comparação entre a reação de imunomicroscopia eletrônica (IME) e o isolamento do vírus em culturas celulares (CC), utilizando as 34 amostras com títulos de HA<4 à 4096 e as 12 amostras com títulos de HA≥64.

Símbolos: A = Amostras com títulos de HA<4 à 4096; B = Amostras com títulos de HA≥64

Resultados	CC	
	A	B
Concordantes		
Pos/Pos	10	08
Neg/Neg	07	00
Discordantes		
Pos/Neg	07	02
Neg/Pos	10	02
% de concordantes	(50,0%)	(66,7%)

imunomicroscopia eletrônica foi de 58,9% para 83,3%. Da mesma maneira, a imunoeletrosmoforese elevou-se de 38,3% para 66,7%: Estes dados demonstraram que nos títulos baixos, a reação de hemaglutinação pode apresentar resultados inespecíficos, embora nós tenhamos obtidos 15 casos com títulos de HA<64 e com positividade em uma ou outra das reações estudadas.

O isolamento de parvovírus em culturas celulares, por ser um método de alta sensibilidade e especificidade tem sido utilizado concomitantemente à reação de hemaglutinação (2, 3, 5, 9, 12, 16, 20).

Entretanto, como os parvovírus não apresentam efeito citopático característico, necessitando, para a sua replicação, de células na fase "S" da mitose (2, 11, 17) o seu isolamento nem sempre é bem sucedido. A comparação por nós realizada demonstrou ser o isolamento do vírus superior à imunoeletrosmoforese e à imunomicroscopia eletrônica, na totalidade das amostras (HA<4 à 4096), e equivalente às duas técnicas nas amostras com títulos de HA≥64.

O emprego da imunoeletrosmoforese no diagnóstico rápido da parvovirose canina merece destaque, por ser uma reação de alta especificidade, simplicidade e rapidez. Em nosso estudo, a imunoeletrosmoforese aparentemente apresentou baixa eficiência nas amostras com títulos hemaglutinantes baixos. A maioria dos resultados positivos ocorreu quando os títulos hemaglutinantes foram elevados e, em apenas três casos, os títulos eram menores que 64, demonstrando assim, a alta especificidade desta reação.

A imunomicroscopia eletrônica, quando comparada à imunoeletrosmoforese, apresentou, na totalidade das amostras, resultados ligeiramente superiores, embora fossem os dois métodos que apresentassem maiores porcentagens de concordância (Tabela 3), tanto na totalidade das amostras (82,3%), como também, nas amostras com títulos de HA≥64 (83,3%).

Ao nosso ver, os quatro métodos estudados são de grande utilidade para o diagnóstico da parvovirose canina, sendo aconselhável, porém, o uso concomitante de, ao menos dois métodos, a fim de se evitar resultados inespecíficos.

Referências Bibliográficas

1. Almeida, J.; Cinader, B. & Howatson, A.F. - The structure of antigen: antibody complexes; a study by electron microscopy. *J. Exp. Med.*, 118:327-339, 1963.
2. Ângelo, M.J.O. - Isolamento de parvovírus de cães durante a epizootia de enterite hemorrágica ocorrida na grande São Paulo, em 1980. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas USP, 1981. (Dissertação de Mestrado).
3. Appel, M.J.G.; Cooper, B.J.; Greisen, H. & Carmichael, L.E. - Status report: canine viral enteritis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173:1516-1518, 1978.
4. Arens, M. & Krauss, H. - Zum nachweis von parvovirus bei infektiosen pastroenteritiden des hundes mittels immunelektronenmikroskopie. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.*, 93:156-157, 1980.
5. Carmichael, L.E.; Joubert, J.C. & Pollock, R.V.H. - Hemagglutination by canine parvovirus: serologic studies an diagnostic applications. *Amer. Vet. Res.*, 4:784-791, 1981.
6. Dea, S.; Roy, R.S. & Begin, M.E. - Counterimmunoelctroosmophoresis for detection of neonatal calf diarrhea coronavirus: methodology and comparison with electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.*, 10:240-244, 1979.
7. Else, R.W. - Fatal haemorrhagic enteritis in a puppy associated with a parvovirus infections. *Vet. Rec.*, 106:14-15, 1979.
8. Frost, J.W. & Klunker, G. - The use of tissue culture for routine diagnosis of canine parvovirus infections. *Zentralbl. Veterinaermed Reihe B*, 31:623-626, 1984.
9. Gagnon, A.N. & Povey, R.C. - A possible parvovirus associated with an epidemic gastroenteritis of dogs in Canada. *Vet. Rec.*, 104:263-264, 1979.
10. Hagiwara, M.K.; July, J.R.; Baccar, M.R. & Ângelo, M.J.O. - Enterite hemorrágica em cães associada à infecção por um parvovírus: nota prévia. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)*, 47:47-49, 1980.

11. Johnson, R.H. - Isolation of a virus from a condition simulate feline panleucopenia in a leopard. *Vet. Rec.*, 76:1008-1013, 1964.
12. Johnson, R. & Spradbrow, P.B. - Isolation from dogs severe enteritis of a parvovirus related to feline panleucopenia virus. *Aust. Vet. J.*, 55:151, 1979.
13. Klingeborn, B. & Moreno-Lopez, J. - Diagnosis experience from a epidemic of canine parvoviral enteritis. *Zentralb. Veterinarmed.*, 27:483-488, 1980.
14. Mathys, A.; Mueller, R.; Pedersen, N.C. & Theilen, G.H. - Comparison of hemagglutination and competitive enzyme-linked immunosorbent assay procedures for detecting canine parvovirus in feces. *Am. J. Vet. Res.*, 44:152-154, 1983.
15. Middleton, P.J.; Petric, M.; Hewitt, C.M.; Szymanski, M.T. & Tam, J.S. - Counter-immunolectro-osmophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (orbivirus) antigen and antibody. *J. Clin. Pathol.*, 29:191-197, 1976.
16. Mochizuki, M.; Hida, S.; Hsuan, S. & Sato, H. - Fecal examination for diagnosis of canine parvovirus infection. *J.PN. J. Vet. Sci.*, 46:587-592, 1984.
17. Rhod II, S.L. - Replication process of the parvovirus H-1. I - Kinetics in a parasychronous. *Cell. J. Virol.*, 11:856-861, 1973.
18. Schwers, A.; Pastoret, P.P.; Dagenais, L. & Aquilarsetien, A. - Utilisation d'une technique de contre-immunolectro-osmophoreses (C.I.E.O.P.) pour la détection des anticorps évidents le parvovirus canin et des antigènes dans les matières fécales. *Ann. Med. Vet.*, 124:255-262, 1980.
19. Timbol, C.R.; Lim, L.M. & Bain, C.B. - Diagnosis of canine parvovirus enteritis. I - The combined use of hemagglutination and hemagglutination inhibition tests on fecal specimens of suspected cases of CPE. *Philipp J. Vet. Med.*, 22:55-66, 1983.
20. Valensa, F.; Misciatelli, M.E. & Belletti, G.L. - Parvovirus associati a gastroenterite e miocardite nei cani: identificazione del virus al microscopio elettronico con applicazione di immuno-electronmicroscopia e rilievi anato-istopatologici. *Atti Soc. Ital. Sci. Vet.*, 34:289, 1980.

EFEITO DOS VÍRUS DA LEUCOSE LINFÓIDE E DA DOENÇA BURSAL INFECIOSA SOBRE A VACINAÇÃO CONTRA A DOENÇA DE NEWCASTLE

Ary Moreira de Souza

Unidade de Apoio ao Programa Nacional de Pesquisa de Saúde Animal/EMBRAPA
Km. 47 - Rodovia Rio/São Paulo
23851 Itaguaí RJ, Brasil

& Carlos Hipólito Romero

Centro Nacional de Suínos e Aves/EMPRAPA
Km 110 da BR53 - Vila Tamanduá
89700 Concórdia SC, Brasil

Resumo

O presente trabalho, compreende a montagem de vários experimentos para melhor estudar o efeito da infecção congênita com o vírus da leucose linfóide (VLL) e a infecção com o vírus da doença bursal infecciosa (VDBI), sobre a proteção conferida pela cepa LaSota do vírus da doença de Newcastle (VDN), em aves Leghorn brancas pertencentes ao plantel da Área de Avicultura da Estação Experimental da PESAGRO-Rio, Km 47 - Rodovia Rio/São Paulo - Itaguaí, RJ. Aos 21 dias de idade todas as aves foram numeradas e sangradas por punção da veia radial direita para separação e coleta de amostras de soro sanguíneo, enquanto que os lotes de números pares foram infectados com VDBI por via ocular. Com a idade de 28 dias, os lotes 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 e 14 foram vacinados contra DN com cepa LaSota por via nasal. Aos 56 dias as aves pertencentes aos lotes vacinados foram agredidas com vírus velogênico da doença de Newcastle (VVNDV) e quando completaram 126 dias as aves pertencentes aos lotes 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13, 14, 15 e 16 também foram agredidas. O efeito da infecção com VLL e o VDBI sobre a proteção conferida pela cepa LaSota e agressão com uma cepa velogênica do VDN variou de modo significativo. Com referência aos congenitamente infectados com VLL esta proteção, nas mesmas circunstâncias variou de 66,7% a 100%, percentuais estes relativos às aves portadoras das duas infecções, o que demonstra que as aves portadoras de VLL e do VDBI são mais deficientes do que aquelas infectadas somente com um dos agentes.

Summary

Effect of the lymphoid leukosis virus and infectious bursal disease virus over the vaccination against Newcastle disease virus

The present work comprises the set up of various tricks to better understand the effect of congenital infection by lymphoid virus (LLV) and infection due to the infectious bursal disease virus (IBVD), over the immunity conferred by the LaSota strain of the Newcastle disease virus (NDV) in white Leghorn chickens belonging to the PESAGRO-Rio. At the age of 21 days each bird received an identification number, they were bleed on the right side of the radial artery to get samples of blood serum, and only the groups

of birds with even identification number were infected with the IBDV by the ocular route. At the age of 28 days, the groups 1, 2, 5, 6, 9, 10, 13 and 14 were vaccinated against ND with the LaSota strain by the nasal route. At the age of 50 days the chickens belonging to the vaccinated groups were challenged with the velogenic virus of the Newcastle disease (VVND), by living together with 10% of the infected birds, while at the age of 126 days the chickens belonging to the groups 1, 2, 3, 6, 9, 10, 13, 14 15 and 16 were also challenged as described above. The effect of infection with the avian leukosis virus and infectious bursal disease over the immunity conferred by the LaSota strain and by the challenge with a velogenic strain of Newcastle disease virus were significant. This protection ranged from 66,7% to 100% in birds congenitally infected with the LLV. These percentuals were derived from chickens that were carriers of the two infectious agents, so the birds carriers of LLV and IBDV were much more deficient than those infected with only one of the two viral agents.

Introdução

Na elaboração do presente trabalho, procurou-se fortalecer a hipótese de que a presença de infecções clínicas concomitantes como a leucose linfóide (LL) e a doença bursal infecciosa (DBI), imunossupressoras, tragam transtornos à imunização contra outras enfermidades, como por exemplo, a doença de Newcastle, cuja prática de vacinação é feita correntemente em todos os plantéis de aves, desde avós até comerciais.

O desenho experimental desenvolvido para este trabalho, compreende a montagem de vários delineamentos experimentais para melhor estudar o efeito da infecção congênita com o vírus da leucose linfóide e a infecção com o vírus da doença bursal infecciosa, sobre a imunidade conferida pela cepa LaSota do vírus da doença de Newcastle, em aves Leghorn brancas de linhagens pertencentes ao plantel da Área de Avicultura da Estação Experimental da PESAGRO-Rio, no município de Itaguaí, Estado do Rio de Janeiro.

Considerando que a doença de Newcastle em plantéis vacinados não seria justificada a não ser na presença de infecções concorrentes, procurou-se relacionar insuficiência de proteção imunológica com a presença de enfermidades subclínicas que depreciam o sistema imunitário, abrindo as portas para infecções que se instalariam com maior facilidade.

Trabalhou-se com aves livres e congenitamente infectadas com VLL; com aves infectadas por via ocular com VDBI, e aves infectadas com amostra velogênica do VDN por coabitacão.

Procurou-se estudar a interferência destas viroses, em conjunto e isoladamente, para observar seus efeitos sobre a resposta imunitária conferida pela vacinação dos lotes em experimento com a cepa vacinal LaSota do VDN.

Material e Métodos

As aves utilizadas no presente trabalho são provenientes de plantéis livres e congenitamente portadores do vírus da leucose linfóide aviária.

Estas linhagens são controladas pelas provas de imunodifusão e fixação do complemento e mantidas livres de outras enfermidades na área de Avicultura da Estação Experimental da PESAGRO-Rio, Km 47 da Rodovia Rio/São Paulo.

A produção de aves livres e congenitamente portadoras de VLL para o presente experimento, teve início através da incubação de ovos oriundos destes plantéis controlados, sendo ambos colocados em incubadoras separadas e a mercê das mesmas condições de temperatura e umidade.

No dia da eclosão, os pintinhos foram separados aleatoriamente em dois grupos de 96 pintos fêmeas totalizando 192 aves que transportadas em caixas apropriadas foram transferidos para o Setor de Ornitopatologia da EMBRAPA (RJ) situada nas proximidades da Estação Experimental. Neste Setor cada grupo de 96 pintinhos foi separado em oito subgrupos de 12 aves cada, perfazendo um total de 16 lotes em experimento, ficando os mesmos alojados em boxes individuais medindo 3,5m² de área.

Os lotes de 1 a 8 corresponderam as aves livres de VLL e os de 9 a 16 corresponderam as congenitamente portadoras de VLL.

As três semanas de idade, todas as aves foram sangradas por punção na veia radial direita, utilizando-se seringas plásticas descartáveis para colheita de sangue. Os soros obtidos de cada amostra de sangue colhida, foram submetidas às provas sorológicas de Inibição de Hemaglutinação (HI) e imunodifusão de ágar gel (AGP) para pesquisa de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle e doença infecciosa bursal respectivamente. Nesta ocasião os lotes de numeração par foram infectados por via ocular com uma dose de 0,1ml do VDBI cujo título viral em ovos embrionados de galinha foi determinado em $10^4 \cdot 3/0,1\text{ml DIF}_{50}$.

A vacinação dos grupos previamente estabelecidos contra o VDN foi realizada às 4 semanas empregando-se a cepa LaSota, mantida pelo Setor de Ornitopatologia e administrada na dose de 0,1ml/ave pela via intranasal, com título viral de $10^{6,6}\text{DIF}_{50}/\text{pinto}$ empregando-se para tal ovos embrionados de galinhas de 9 dias de incubação.

Às 8 semanas de idade, as aves foram sangradas por punção na veia radial direita, utilizando-se seringas plásticas descartáveis para colheita de sangue. Os soros obtidos de cada amostra sanguínea colhida foram submetidos às provas sorológicas de HI e AGP para pesquisa de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle e doença infecciosa bursal respectivamente.

As aves pertencentes aos lotes de 1 a 4 e 9 a 12 foram, nesta ocasião desafiadas por coabitAÇÃO com 10% de aves infectadas com dose de 0,1ml via intranasal, com uma cepa velogênica denominada SO-93 (10) do vírus da doença de Newcastle ficando então isoladas das demais, para observação do quadro clínico e anatomo-patológico causado pela cepa velogênica empregada.

Às 18 semanas as aves correspondentes aos lotes 1, 2, 9 e 10 sobreviventes ao desafio às 8 semanas (por haverem sido vacinadas contra o vírus da doença de Newcastle), como também os lotes 5, 13, 14, 15 e 16 foram desafiadas por coabitAÇÃO com 10% de aves infectadas com uma dose de 0,1ml via intranasal de uma cepa velogênica denominada SO-93 (10) do vírus da doença de Newcastle, ficando nesta ocasião isoladas das demais, para observação do quadro clínico e lesões anatomo-patológicas causadas pela cepa virulenta empregada.

Resultados e Discussão

Linhagens consideradas sensíveis ao VLL foram estudadas por Crittenden & col. (4), os quais empregaram aves das linhagens 61, 63, 72, 100, 15B e 1515 entre outras para estudar a ação do VLL em embriões da progénie. O emprego de linhagens mais sensíveis é muito importante para o estudo desta enfermidade. As aves utilizadas neste trabalho não são classificadas como altamente sensíveis, apenas foram selecionadas como portadoras e livres do VLL.

Utilizaram-se aves de progénie controlada e sabidamente positivas e negativas; já no experimento de De Boer & col. (5) os autores estudaram oito grupos de pintos de um dia e oito semanas de idade, os quais foram postos em contato para infecção com vírus. Achou-se mais fácil e prático a utilização de pintos infectados verticalmente, pois torna-se bem mais seguro o controle dos lotes a serem trabalhados.

O estudo do ciclo de infecção foi feito por Purchase (17) que considerou ser a demonstração de anticorpos pelo método mais tradicional como o RIF e fixação de complemento muito seguro para evidenciar a presença da doença. Apesar de ser um método qualitativo a AGP foi de extrema validade na seleção das aves, por ser considerado de boa qualidade.

Antes da seleção das aves empregadas neste trabalho foi realizado minucioso estudo para separação do plantel em dois lotes, o positivo e o negativo (18) o que contribuiu de maneira decisiva para escolha do material que seria utilizado no desenvolvimento do experimento.

Os pintos foram escolhidos para composição de 16 lotes de modo que cada lote fosse constituído de 12 pintos, o que foi facilmente conseguido com aqueles lotes formados por pintos da linhagem negativa para o VLL, enquanto que não foi possível manter este mesmo número até o início do experimento, às 3 semanas de idade, com os lotes constituídos com os pintos da linhagem positiva congenitamente para o VLL. Este acontecimento prende-se ao fato de que os pintos portadores são mais fracos e morrem com mais facilidade no início de vida, não nos possibilitando manter um número uniforme de pintos nos diferentes lotes.

A cepa de VDBI utilizada para infectar aves de três semanas de idade, revelou ser de moderada patogenicidade, pois não determinou lesões muito acentuadas na bursa de Fabricius das aves, bem como não provocou a morte de nenhum animal inoculado, observando-se apenas anorexia e leve depressão após 96 horas da infecção. Esta cepa é idêntica às usadas por Winterfield & col. (22) que, quando inoculadas em pintos suscetíveis, tornaram-se transitoriamente víremicos e 10 dias após a inoculação não foi possível mais o isolamento de vírus dos tecidos nem se verificou a disseminação da enfermidade em aves colocadas em contato 10 dias após a infecção.

Fadly & Nazerian (8) infectaram pintos Leghorn brancos no mesmo dia, porém de idades diferentes, 1, 5 e 11 semanas, empregando a mesma amostra usada por Winterfield & col. (22), e observaram que os de 5 semanas revelaram severos sinais clínicos e apresentavam reduzidos níveis de complemento no soro 2 a 4 dias após a inoculação, o que não foi notado nas aves inoculadas na primeira e décima primeira

Tabela 1 - Efeito da infecção com vírus da leucose aviária e o vírus bursal infecciosa² sobre a imunidade vacinal conferida pela cepa LaSota³ em aves Leghorn brancas contra agressão com uma cepa velogênica do vírus da doença de Newcastle⁴.

Símbolos: ¹ = Progénie de matrizes não eliminadoras (-) e eliminadoras (+) de antígeno específico de grupo do vírus da leucose aviária; ² = Aves livres (-) ou infectadas (+) com o vírus da doença bursal infecciosa pela via ocular ($10^4.3\text{DIE}_{50}/\text{pinto}$); ³ = Aves não vacinadas (-) ou vacinadas (+) com a cepa LaSota pela via nasal ($10^{6.6}\text{DIE}_{50}/\text{pinto}$); ⁴ = Aves não agredidas (-) ou agredidas (+) por coabitacão de aves infectadas com uma cepa velogênica do vírus da doença de Newcastle; ⁵NR = Não realizado por ter morrido em consequência da agressão com vírus da doença de Newcastle

lote	Idade de infecção das aves em semanas					Mortalidade pela agressão com o VDN à: 8 semanas				
	VIA ¹ congenita	VDBI ² 3	LaSota ³ 4	VDN ⁵ 8	VDN ⁵ 16	Nº aves em risco	Mortes não específicas	Mortes específicas	Proteção %	
1	-	-	+	+	+	12	0	0	100,0	
2	-	+	+	+	+	12	0	0	100,0	
3	-	-	-	+	NR ⁵	12	0	12	0,0	
4	-	+	-	+	NR	12	0	12	0,0	
5	-	-	+	-	+	12	0	0	100,0	
6	-	+	+	-	+	12	0	0	100,0	
7	-	-	-	-	-	12	1	0	100,0	
8	-	+	-	-	+	12	0	0	100,0	
9	+	-	+	+	+	9	0	0	100,0	
10	+	+	+	+	+	10	2	0	100,0	
11	+	-	-	+	NR	9	0	9	0,0	
12	+	+	-	+	NR	10	0	10	0,0	
13	+	-	+	-	+	9	0	0	100,0	
14	+	+	+	-	+	10	1	0	100,0	
15	+	-	-	-	+	9	0	0	100,0	
16	+	+	-	-	+	10	0	0	100,0	

semanas. Isto confirma que a idade ideal de infecção está entre a segunda e sexta semanas de idade, o que nos conduziu a utilizar neste trabalho aves com três semanas de idade, por considerar-se ser esta a faixa etária ideal para infecção experimental, o que foi confirmado com os resultados obtidos.

Ley & col. (13) em estudos sorológicos, histológicos e patologia clínica em vários lotes relataram que nas pesquisas histopatológicas de tecidos linfóides, notaram que a lesão predominante foi a necrose linfóide da bursa de Fabricius, a mesma lesão encontrada nas aves de experimentação do presente trabalho. Esta lesão é, sem dúvida alguma, a responsável pelo efeito imunodepressor provocado por este vírus, embora Lucio & Hitchner (14); Hirai & col. (12) e Edwards & col. (7) assinalam uma ação imunossupressora, da qual os autores discordam por julgarem não existir completa ausência de imunidade, mas sim deficiência imunológica (Tabela 2), por mais violenta que seja a patogenicidade do vírus empregado no estudo, uma vez que, outros órgãos linfóides agem para compensar a deficiência da bursa infectada. Deverá também ser levado em consideração que anticorpos passivos impedem a infecção das aves jovens e da atrofia da bursa; todavia, sempre ocorrerá alguma interferência na imunidade ativa.

A amostra de VDBI utilizada neste trabalho pode ser considerada de patogenicidade mediana ou moderada, de acordo com seu comportamento nos pintos inoculados, não nos detendo em maiores estudos para determinar o grau de patogenicidade, o que foi feito por Cheville (3) que estudou a patogenicidade de amostras de vírus da doença de Gumboro empregando microscopia ótica, fluorescente e eletrônica de bursa, timo e baço. Posteriormente Dongonkar & col. (6) observaram que lesões mais severas foram reveladas na bursa de quatro dias após a inoculação, enquanto as observações dos autores esclareceram que a amostra apresentou seu maior efeito cinco dias após a inoculação.

Tabela 2 - Efeito da infecção com vírus da leucose aviária e o vírus bursal infeccioso² sobre a imunidade vacinal conferida pela cepa LaSota³ em aves Leghorn brancas contra agressão com uma cepa velogênica do vírus da doença de Newcastle⁴.

Símbolos: ¹ = Progénie de matrizes não eliminadoras (-) e eliminadoras (+) de antígeno específico de grupo do vírus da leucose aviária; ² = Aves livres (-) ou infectadas (+) com o vírus da doença bursal infecciosa pela via ocular ($10^6.3$ DIE50/pinto); ³ = Aves não vacinadas (-) ou vacinadas (+) com a cepa LaSota pela via nasal ($10^6.6$ DIE50/pinto); ⁴ = Aves não agredidas (-) ou agredidas (+) por coabitacão de aves infectadas com uma cepa velogênica do vírus da doença de Newcastle; ⁵NR = Não realizado por ter morrido em consequência da agressão com vírus da doença de Newcastle às 8 semanas.

Lote	Idade de infecção das aves em semanas					Mortalidade pela agressão com o VDN à: 8 semanas				
	VLA ¹ congênita	VDBI ² 3	LaSota ³ 4	VDN ⁵ 8	VDN ⁵ 18	Nº aves em risco	Mortes não específicas	Mortes específicas	Proteção %	
1	-	-	+	+	+	12	0	0	100,0	
2	-	+	+	+	+	10	0	0	100,0	
3	-	-	-	+	NR ⁵	NR	NR	NR	NR	
4	-	+	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	
5	-	-	+	-	+	11	0	1	90,9	
6	-	+	+	-	+	11	0	0	100,0	
7	-	-	-	-	-	10	0	9	10,0	
8	-	+	-	-	+	9	0	8	12,5	
9	+	-	+	+	+	7	0	0	100,0	
10	+	+	+	+	+	6	0	0	100,0	
11	+	-	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	
12	+	+	-	+	NR	NR	NR	NR	NR	
13	+	-	+	-	+	9	0	1	88,9	
14	+	+	+	-	+	9	0	3	66,7	
15	+	-	-	-	+	8	0	8	0,0	
16	+	+	-	-	+	7	0	7	0,0	

Tabela 3 - Média e variação dos títulos de anticorpos¹ inibidores da hemaglutinação do vírus da doença de Newcastle em aves Leghorn brancas em experimentação.

Símbolos: ¹ = Ensaíados na microprova de inibição da hemaglutinação. Média e limites; ² = Progênie de matrizes não eliminadoras (-) e eliminadoras (+) de antígeno específico de grupo do vírus da leucose aviária; ³ = Aves livres (-) ou infectadas (+) com o vírus da doença bursal infecciosa pela via ocular ($10^4 \cdot 3$ DIE50/pinto); ⁴ = Aves não vacinadas (-) ou vacinadas (+) com a cepa LaSota pela via nasal ($10^6 \cdot 6$ DIE50/pinto); ⁵ = Aves não agredidas (-) ou agredidas (+) por coabitacão de aves infectadas com uma cepa velogênica do vírus da doença de Newcastle; ⁶NR = Não realizado por ter morrido em consequência da agressão com o vírus da doença de Newcastle

Lote	Idade da infecção das aves em semanas						Idade das aves em semanas			
	VIA ² congênita	VDBI ³ 3	VDBI ³ 4	LaSota ⁴ -	VDN ⁵ 8	VDN ⁵ 18	3	8	11	18
1	-	-	+	+	+	0,0	22,2(0-10) ¹	422,5(10-2560)	9,2(0-20)	50,0(0-160)
2	-	+	+	+	+	0,0	18,3(0-40)	115,0(20-320)	6,0(0-20)	65,0(0-320)
3	-	-	-	-	-	0,0	0,0	NR	NR	NR
4	-	+	-	+	NR ⁶	0,0	0,0	NR	NR	NR
5	-	-	+	-	+	0,0	13,0(0-40)	10,0(0-20)	0,0	37,0(10-18)
6	-	+	+	-	+	0,0	16,6(0-14)	15,0(0-40)	0,9(0-10)	63,6(0-160)
7	-	-	-	-	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8	-	+	-	-	-	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	+	-	+	+	+	0,0	12,0(0-40)	162,2(20-640)	22,9(0-160)	30,0(0-80)
10	+	+	+	+	+	0,0	20,0(0-40)	92,5(20-320)	3,3(0-10)	113,3(10-320)
11	+	-	-	-	NR	0,0	0,0	NR	NR	NR
12	+	+	-	+	NR	0,0	0,0	NR	NR	NR
13	+	-	+	-	+	0,0	13,0(0-40)	110,0(0-20)	1,1(0-10)	67,5(0-160)
14	+	+	+	-	+	0,0	6,0(0-40)	28,9(10-80)	3,3(0-10)	148,3(10-320)
15	+	-	-	-	+	0,0	0,0	0,0	0,0	NR
16	+	+	-	-	+	0,0	0,0	0,0	0,0	20,0

O estudo realizado por Pejkovski & col. (16) se aproximou deste trabalho, visto que estes autores também estudaram o efeito imunossupressor do VDBI em aves vacinadas contra bronquite infecciosa, verificando que em determinadas circunstâncias as aves infectadas com VDBI apresentaram depressão na imunidade. Em trabalho semelhante, Meulemans & Halen (15) e Takase & col. (21) infectaram simultaneamente aves com VDBI e VDN e demonstraram que imunodepressão depende da idade das aves, da virulência da amostra empregada e da idade de vacinação contra a doença de Newcastle. No presente trabalho ficou demonstrada também esta condição, visto a idade escolhida para infecção. Esta situação ficou bem evidenciada no trabalho de Ajinkya & col. (1) quando estes autores estudavam surtos de Newcastle na Índia.

A cepa LaSota do VDN conferiu boa proteção às oito semanas de idade, mesmo em aves congenitamente infectadas com VIL e inoculadas com VDBI atingindo até 100% das aves de todos os lotes vacinados (Tabela 1) e uma proteção de variou de 66,7 a 100% quando sofreram o segundo desafio às 18 semanas de idade (Tabela 2).

A proteção conferida as aves pela amostra LaSota foi estudada sob três parâmetros distintos, através de testes de HI (Tabela 3), por neutralização do vírus (Tabela 4) e finalmente, provas de agressão por coabitacão com amostra patogênica (Tabelas 1 e 2). Spradbow & col. (20) também estudaram a resposta imune produzida por vacinação em vários lotes de aves entre 4 e 12 meses de idade com amostra Australiana e avaliaram a proteção conferida por títulos de HI e por agressão com vírus asiático inoculado por via intramuscular, revelando proteção de 100% das aves vacinadas. Shukla & col. (19) experimentaram, outrossim, aves vacinadas e desafiadas com amostra virulenta Mukteswar, a partir de 24 horas e intervalos iguais até 168 horas e concluíram que houve proteção de 50% quando a vacina foi administrada 168 horas antes do desafio, enquanto que com intervalos menores o efeito foi praticamente nulo.

Tabela 4 - Índices de neutralização dos soros das aves vacinadas com cepa LaSota frente ao vírus velogênico S0-93.

Símbolos: 1 = Progenie de matrizes não eliminadoras (-) e eliminadoras (+) de antígeno específico de grupo do vírus da leucose; 2 = Aves livres (-) ou infectadas (+) com vírus da doença infecciosa pela via ocular ($10^{4.3}$ DIE₅₀/pinto); 3 = Aves não vacinadas (-) ou vacinadas (+) com a cepa LaSota pela via nasal ($10^{6.6}$ DIE₅₀/pinto); 4NR = Não realizado por haver morrido em consequência da agressão com vírus velogênico da doença de Newcastle

Lote	Idade de infecção em semanas			Índice de neutralização às 4 semanas		
	VIA ¹ congênita	VDBI ² 3	LaSota ³ 4	Grupo A	Grupo B	Média AB
1	-	-	+	3.2	3.6	3.40
2	-	+	+	3.1	2.9	3.00
3	-	-	-	NR	NR	
4	-	+	-	NR	NR	
5	-	-	+	3.7	3.8	3.75
6	-	+	+	3.3	3.6	3.45
7	-	-	-	NR	NR	
8	-	+	-	NR	NR	
9	+	-	+	3.7	3.7	3.70
10	+	+	+	2.8	3.2	3.05
11	+	-	-	NR	NR	
12	+	+	-	NR	NR	
13	+	-	+	3.3	3.8	3.55
14	+	+	+	2.8	3.2	3.00
15	+	-	-	NR	NR	
16	+	+	-	NR	NR	

No trabalho de Brada & Silva (2) observaram estes autores que os ovos embrionados procedentes de galinhas vacinadas não prejudicavam o cultivo do vírus antes do 14º dia de incubação. Observou durante o desenvolvimento deste trabalho caracterização de inviabilidade do uso de embriões de pinto procedentes de ovos de galinhas vacinadas, principalmente quando se trata de um vírus de baixa patogenicidade, como amostra LaSota.

O estudo da patotipagem de amostras de vírus da doença de Newcastle caracteriza com facilidade a patogenicidade da cepa. Hanson & col. (11) estudaram a patotipagem de amostras viscerotrópicas do VDN em isolamentos ocorridos de 1926 a 1946, baseando-se em duas importantes diferenças: 1) demonstração da hemaglutinação (HA) que é inibida por anticorpos específicos e 2) demonstração de que o vírus é letal para frangos e produz lesões hemorrágicas no intestino, destacando como amostra mais patogênica a Texas. Gomez-Lillo & col. (9) fizeram estudo semelhante empregando técnica de soroneutralização achando que não houve uma diferenciação aparente, devido a larga variação na capacidade de neutralização ou títulos do soro empregado.

No teste de neutralização foram feitas duas misturas de soros de cada lote de aves vacinadas, designados por A e B. Deste modo haviam 16 soros correspondentes a duas amostras de cada lote de aves (Tabela 4).

Referências Bibliográficas

1. Ajinkya, S.M.; Survashe, B.D. & Sardeshpande, P.D. - Breakdown in immunity to ranikhet disease (Newcastle disease) with infectious bursal disease (Gumboro disease) in broiler chickens. Indian Vet. J., 57:265-269, 1980.
2. Brada, W. & Silva, M.M. - Observações realizadas sobre doença de Newcastle durante trabalhos de diagnóstico. Pesq. Agrop. Bras., 3:319-324, 1968.

3. Cheville, N.F. - Studies on the pathogenesis of Gumboro disease in the bursa of Fabricius, spleen and thymus of the chickens. *Am. J. Pathol.*, 51:527-551, 1967.
4. Crittenden, L.B.; Smith, E.J. & Gulvas, F.A. - Endogenous virus expression in chicken lines maintained at the poultry research laboratory. *Virology*, 95:434-444, 1979.
5. De Boer, G.F.; Maas, H.J.L.; Van Vloten, J. & Groenendal, J.E. - Horizontal transmission of lymphoid leukosis virus: influence of age, maternal antibodies and degree of contact exposure. *Avian Pathol.*, 10:343-358, 1981.
6. Dongonkar, V.D.; Kolte, G.N. & Rao, K.N.P. - Some observations on the histopathology of experimentally infected chickens with infectious bursal disease virus. *Indian Vet. J.*, 56:541-545, 1979.
7. Edwards, K.R.; Muskett, J.C. & Thornton, D.H. - Duration of immunosuppression caused by a vaccine strain of infectious bursal disease virus. *Research Vet. Sci.*, 32:79-83, 1982.
8. Fadly, A.M. & Nazerian, K. - Pathogenesis of infectious bursal disease in chickens infected with virus at various ages. *Avian Dis.*, 27:714-723, 1983.
9. Gomez-Lillo, M.; Bankowski, R.A. & Wiggins, A.D. - Antigenic relationship among viscerotropic and domestic strains of Newcastle disease virus. *Am. J. Vet. Res.*, 35:472-475, 1974.
10. Guimarães, I.G. - Contribuição ao estudo do comportamento de amostras de campo do vírus da doença de Newcastle no Estado do Rio de Janeiro, 1979. (Tese de Mestrado).
11. Hanson, R.P.; Spalatin, J. & Jacobson, G.S. - The viscerotropic pathotype of Newcastle disease virus. *Avian Dis.*, 17:354-361, 1973.
12. Hirai, K.; Kunihiro, K. & Shimakura, S. - Characterization of immunosuppression in chickens by infectious bursal disease virus. *Avian Dis.*, 24:950-965, 1980.
13. Ley, D.H.; Yamamoto, R. & Bickford, A.A. - The pathogenesis of infectious bursal disease: serologic, histopathologic and clinical chemical observations. *Avian Dis.*, 27:1060-1085, 1983.
14. Lucio, B. & Hitchner, S.R. - Immunosuppression and active response indice by infectious bursal disease virus in chickens with passive antibodies. *Avian Dis.*, 24:189-196, 1980.
15. Meulemans, G. & Halen, P. - The immunodepressive effect of infectious bursal agent on vaccination against Newcastle disease. *Res. Vet. Sci.*, 22:222-224, 1977.
16. Pejkowski, C.; Develaar, F.C. & Rouwenhoven, B. - Immunosuppressive effect of infectious bursal disease virus vaccination against infectious bronchitis. *Avian Pathol.*, 81:95-106, 1979.
17. Purchase, H.G. - The cycle of infection with leukosis viruses. *J.S. Afr. Vet. Med. Ass.*, 40:25-30, 1969.
18. Romero, C.H.; Rowe, C.A.; Resende, O.A.; Dias, P.G.; Santos, M.W. & Souza, A.M. - A different approach for obtaining progeny free of avian lymphoid leukosis viruses. *Advances in Comparative Leukemia Research*, 1980.
19. Shukla, S.C.; Sharma, S.N. & Tanwani, S.K. - Vaccination with CDF-66 strain of Newcastle disease virus. *Trop. Anim. Hlth. Prod.*, 14:15-19, 1982.
20. Spradbrown, P.B.; Ibrahim, A.L.; Chulan, U.; Milleken, G.; Shapcott, R. & Kingston, D. - The response of australian chickens naturally infected with avirulent Newcastle disease virus to challenge with velogenic Newcastle disease virus. *Australian Vet. J.*, 56:580-584, 1980.
21. Takase, K.; Kamikawa, S. & Yamada, S. - Booster effect of revaccination against Newcastle disease on chickens infected with infectious bursal disease virus. *Jpn. J. Vt. Sci.*, 42:599-601, 1980.
22. Winterfield, R.W.; Fadly, A.M. & Bickford, A. - Infectivity and distribution of infectious bursal disease virus in the chickens: persistence of the virus and lesions. *Avian Dis.*, 16:622-632, 1972.

RESISTÊNCIA CROMOSSÔMICA À PENICILINA EM *NEISSERIA GONORRHOEAE**^{*}

Marcelo Magalhães

Deptº de Medicina Tropical
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Cidade Universitária
50739 Recife PE, Brasil

Resumo

Avaliou-se o problema da resistência cromossômica à penicilina entre linhagens clínicas de *Neisseria gonorrhoeae* isoladas no Recife, Brasil. Empregando-se o método das diluições em ágar verificou-se, para 181 culturas de gonococos beta-lactamase negativos, que a concentração inibitória mínima (CIM) da penicilina G variou entre 0,03 e 2 μ g/ml. As MICs 50 e 90 foram 0,14 e 0,77 μ g/ml, respectivamente. As MICs da penicilina para 24 (13,3%) cepas de gonococos foram \geq 1 μ g/ml. Tais culturas foram consideradas cromossomicamente resistentes. Todas pertenciam ao sorogrupo IB e foram notavelmente mais resistentes à tetraciclina e tianfenicol. Os presentes resultados mostram que houve elevação das CIMs, em relação aquelas observadas para os gonococos isolados, nesse mesmo laboratório, em 1984.

Summary

Chromossomic resistance to penicillin in Neisseria gonorrhoeae

The problem of chromosomally mediated resistance to penicillin among clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* was evaluated in Recife, Brasil. By using an agar dilution technique the minimal inhibitory concentration (MIC) of penicillin G, for 181 beta-lactamase negative gonococcal cultures, ranged between 0,03 and 2 μ g/ml. MICs 50 and 90 were 0.14 and 0.77 μ g/ml, respectively. For 24 (13.3%) of gonococcal strains MICs of penicillin were \geq 1 μ g/ml. Such cultures were considered chromosomally resistant. All belonged to serogroup IB and were notably more resistant to tetracycline and thiampenicol. Present findings represent increases when compared with the MICs for gonococci isolated, in this same laboratory, in 1984.

Introdução

Na década de 40, quando a penicilina G começou a ser utilizada no tratamento da gonorreia, a concentração inibitória mínima (CIM) da droga para a *Neisseria gonorrhoeae* situava-se entre 0,003 e 0,3 μ g/ml (15). Desde então, um gradual mas constante crescimento nos níveis da CIM vem sendo observado. Nos Estados Unidos, por exemplo, o número de amostras de gonococos, requerendo mais de 0,03 μ g/ml de penicilina para inibição do crescimento, elevou-se de 0,6%, antes de 1955, para 42%, em 1965, e para 65% em 1969 (9). Isso culminou, em 1983, com o aparecimento de surtos de infecções associadas a linhagens de gonococos exigindo uma CIM de penicilina superior ou igual a 1 μ g/ml, nível de resistência quase sempre

*Trabalho financiado pelo CNPq (Processo nº 405.101/85).

acompanhado de insucessos terapêuticos (5). Tais linhagens, muito comuns nas Filipinas (21), foram chamadas *N. gonorrhoeae* cromossomicamente resistentes (NGCR) (16), para distingui-las das produtoras de penicilinase (NGPP), nas quais o mecanismo de resistência é mediado por plasmídios (14). O grande problema de ordem terapêutica, proporcionado pela resistência mutacional ou cromossônica, é que a perda de sensibilidade à penicilina é geralmente acompanhada pela perda de sensibilidade a outros agentes antibacterianos, estruturalmente não relacionados (4, 20).

Nos países desenvolvidos, monitoriza-se, periodicamente, a sensibilidade da *N. gonorrhoeae* à penicilina. Sugeriu-se que o declínio de susceptibilidade ao antibiótico é indicativo de que a gonorréia está fora de controle (10). No Brasil, de modo geral, e no Recife, em particular, pouco se sabe a esse respeito. Isso estimulou o presente trabalho, programado para avaliar a situação da resistência cromossônica à penicilina, entre linhagens clínicas de gonorreias. Além disso, complementou-se a investigação comparando-se a atividade, *in vitro*, de cinco outras drogas, úteis na terapêutica alternativa da gonorréia, sobre linhagens sensíveis e de NGCR.

Material e Métodos

Coleção das culturas - Entre janeiro e outubro de 1986, foram isoladas, em laboratório privado de microbiologia, 300 culturas de *N. gonorrhoeae*. Essas culturas foram suspensas em 0,2ml de sangue desfibrinado de coelho e conservadas a -70°C para estudo posterior.

Isolamento e identificação dos gonococos - Os espécimes clínicos foram cultivados em meio cidade de Nova York (MCNY) (22), a 36°C, em atmosfera de 7% de CO₂. Após 24h de incubação, as colônias suspeitas foram confirmadas como *N. gonorrhoeae*: se constituídas por diplococos Gram negativos, se reativas aos testes da oxidase e catalase e se produziram a prolil-amino-peptidase ao teste Gonocheck II (E.Y. Laboratories). Todas as cepas de *N. gonorrhoeae* foram examinadas para produção de beta-lactamase pelo método da cefalosporina cromogênica (12).

Testes de sensibilidade - Foram realizados pelo método das diluições em ágar, em meio GC (Difco) adicionado de Suplemento II (Merck). As drogas antimicrobianas foram testadas em diluições sucessivas, à razão de 2, nas seguintes concentrações: penicilina G (Squibb) 2 a 0,015; tetraciclina (Hoechst) 16 a 0,12; tianfenicol (Zambon) 4 a 0,12; espectinomicina (Upjohn) 50 a 3,12; cefotaxima (Hoechst) 0,128 a 0,004 e rosoxacina (Winthrop) 0,128 a 0,004µg/ml. As culturas foram degeladas a temperatura ambiente e inoculadas em placas de MCNY. Após 16 a 18h de incubação, o crescimento bacteriano foi suspenso em caldo de coração e cérebro (Difco), diluído e depositado nos meios contendo as drogas e controles, com a ajuda de um replicador de Steer, de maneira que o inóculo contivesse, aproximadamente, 5 x 10³ unidades formadoras de colônias, após um período de incubação de 24h, a 36°C, em estufa de CO₂.

Inicialmente, determinou-se a CIM da penicilina contra 181 cepas de *N. gonorrhoeae*, escolhidas ao acaso dentre 275 culturas beta-lactamase negativas. Como controle, inclui-se a cultura padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Um vez determinada a CIM, baseando-se em classificação arbitrária (17), selecionaram-se 16 cepas sensíveis (CIM ≤ 0,06µg/ml) e 24 resistentes (CIM ≥ 1µg/ml). Essas culturas foram então testadas, frente aos demais agentes antimicrobianos, para determinarem-se as CIM 50 e 90, isto é, as concentrações de droga requeridas para inibir 50% e 90% das linhagens, respectivamente.

Grupamento sorológico - Os gonococos foram classificados, como pertencentes ao sorogrupo IA (WI) ou IB (WII, III), através da coaglutinação, empregando-se anticorpos monoclonais obtidos comercialmente (Pharmacia). Na realização do teste obedeceram-se instruções do fabricante.

Análise estatística - Na avaliação dos resultados empregaram-se o teste do Chi

quadrado e a prova da vero-máxima semelhança com o fator de correção de Williams, aceitando-se como nível de significância o valor correspondente a 0,05 (19).

Resultados

As determinações da CIM da penicilina G para as 181 culturas de gonococos estão representadas na Figura 1. Pelo critério adotado (17), 19 estirpes (10,5%) foram consideradas sensíveis, 138 (76,2%) como moderadamente resistentes e 24 (13,3%) como resistentes. As probabilidades de isolamento, na rotina clínica, de cepas moderadamente resistentes são significantes ($p<0,001$). As CIM 50 e CIM 90 foram respectivamente 0,14 e 0,77 µg/ml. Nas mesmas condições teste, a CIM da penicilina para o *S. aureus* padrão foi igual a 0,03 µg/ml.

Os resultados dos testes de sensibilidade das culturas de *Neisseria gonorrhoeae*, resistentes e sensíveis à penicilina, aos outros agentes antimicrobianos, estão sintetizados na Tabela 1. Exceção à espectinomicina, as NGCR foram menos sensíveis a essas drogas que as linhagens penicilina sensíveis. Isso ficou evidente quando se relacionou a CIM 90 das cepas resistentes com a CIM 90 das cepas sensíveis. Desse modo, as NGCR foram 7 vezes mais resistentes à tetraciclina; 8 ao tianfenicol; 5 à cefotaxima e 2 vezes à rosoxacina.

Os resultados do sorogrupamento de 174 linhagens de gonococos, não produtores de beta-lactamase, estão expostos na Tabela 2. Todas as 24 cepas de NGCR pertenciam ao sorogrupo IB. Por outro lado, as cepas sensíveis foram igualmente distribuídas entre os sorogrupos IA e IB. A análise estatística mostrou que há uma associação entre níveis de resistência à penicilina e sorogrupo. As linhagens moderadamente resistentes e resistentes foram mais frequentemente distribuídas no sorogrupo IB ($p<0,01$).

Discussão

Os resultados indicam que a frequência de isolamento de linhagens moderadamente resistentes e de NGCR estão evoluindo no Recife, o que poderá, em futuro próximo, prejudicar a posição da penicilina, como medicamento de escolha no tratamento da gonorreia. Isso ficou evidente, quando os atuais índices foram comparados com outros obtidos em estudo similar realizado em 1984 (M. Magalhães, tese, prof. titular de Microbiologia Médica, UFPE). os dados referentes a 1986 mostraram uma elevação de três pontos percentuais quanto ao isolamento de NGCR.

Figura 1 - Sensibilidade à penicilina G entre 181 culturas de gonococos beta-lactamase negativos

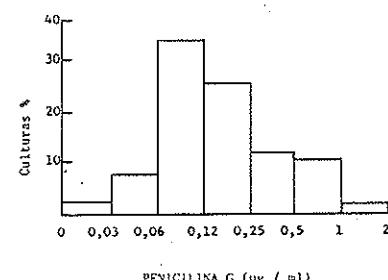


Tabela 1 - Sensibilidade comparativa entre linhagens de *N. gonorrhoeae* penicilina sensíveis e cromossomicamente resistentes a cinco antibacterianos

Antibacteriano	Sensíveis (n= 16)			Resistentes (n= 24)		
	CIM (µg/ml)			CIM (µg/ml)		
	Variação	50	90	Variação	50	90
Tetraciclina	0,12 - 1	0,35	0,57	1 - 8	2,36	3,96
Tianfenicol	0,25	0,25	0,25	1 - 2	1,5	1,9
Espectinomicina	6,25 - 25	9,4	21,9	6,25 - 25	15	22,5
Cefotaxima	0,002 - 0,004	0,002	0,003	0,008 - 0,016	0,012	0,015
Rosoxacina	0,008 - 0,016	0,008	0,014	0,016 - 0,032	0,022	0,029

Embora não seja seguro extrapolar conclusões de ordem terapêutica, baseando-se apenas em resultados de testes de sensibilidade, *in vitro*, a experiência internacional mostra que há correlação entre os níveis de CIM de determinados agentes antimicrobianos, como a penicilina, tetraciclina e tianfenicol, para as linhagens de *N. gonorrhoeae* infectantes, e sucesso no tratamento (21). A esse respeito, entretanto, os resultados de avaliações terapêuticas de gonorréias associadas a linhagens exigindo uma CIM de penicilina $\geq 1\mu\text{g/ml}$ não são uniformes. Em Manilha obteve-se uma taxa de insucesso da ordem de 21% (21), enquanto na Carolina do Norte 94% dos casos de gonorréia, ligados etiologicamente às NGCR, não responderam ao tratamento (5).

A ocorrência de NGCR, no Recife, não implica a existência do problema em outras partes do Brasil. Em Belo Horizonte, pelo menos até 1984, elas não foram encontradas. Nessa cidade, a CIM da penicilina para os gonorocos foram relativamente muito baixas, oscilando entre 0,005 e 0,25 $\mu\text{g/ml}$ (1). Isso exemplifica a necessidade de cuidadosos estudos clínico-bacteriológicos regionais, antes que se possa sugerir o abandono da penicilina no tratamento da gonorréia. A penicilina é única, no tratamento da doença gonocócica, por ser também capaz de abortar infecções sifilíticas incipientes (7). Além disso, a seleção de um outro medicamento antigonocócico, eventual substituto da penicilina, não é decisão simples. Uma das características da resistência cromossómica à penicilina, observada nessa e em investigações anteriores (1, 4, 6, 11), é a diminuição concomitante da sensibilidade do gonococo penicilina resistente a outras drogas não relacionadas. Isso decorre das mutações nos "loci" pen B e mtr terem efeito pleiotrópico, ocasionando resistência simultânea à penicilina, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina (20). No que concerne à tetraciclina, os resultados dos testes de sensibilidade indicam que essa poderia ser pouco eficiente no tratamento de infecções produzidas por NGCR. Demonstrou-se, anteriormente, que os casos de insucesso terapêutico são mais frequentes quando a CIM do antibiótico atinge 1 $\mu\text{g/ml}$ (8). Nas Filipinas, onde a frequência de gonorocos penicilina resistentes é elevada, o índice previsível de falha com o uso da tetraciclina é de 43% (13). O tianfenicol, também, mostrou-se muito menos ativo contra as NGCR. Na presente série, sua CIM 90 para as cepas resistentes aproximou-se de 2 $\mu\text{g/ml}$, nível crítico responsável por maior incidência de malogros terapêuticos (21). Dentre as drogas restantes: espectinomicina, cefotaxima e rosoxacina, a última, além de eficiente (20), tem a vantagem da administração "per os". Recentemente, uma nova quinolina, a ciprofloxacina, na ínfima dose de 100mg, foi capaz de curar 100% dos casos de gonorréias masculinas não complicadas (18).

À semelhança das NGCR isoladas de várias cidades estadunidenses (16), todas as 24 cepas pernambucanas foram classificadas no grupo IB. Isso, entretanto, não implica identidade de linhagens, desde que a associação entre o sorogrupo IB e resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, em *N. gonorrhoeae*, é fato bem conhecido (3). Nesta conexão, é possível que a notável predominância de gonorocos pertencentes ao sorogrupo IB, detectada no Recife, resulte da pequena frequência (10,5%) de linhagens penicilina sensíveis.

Referências Bibliográficas

1. Antunes, S.G.; Damasceno, C.A.V. & Cisalpino, E.O. - Perfil de susceptibilidade de *Neisseria gonorrhoeae* a antimicrobianos em Belo Horizonte. Rev. Microbiol. (São Paulo), 15:217-221, 1984.
2. Belda, W.; Fagundes, L.J.; Lombardi, C.; Santos, J.M.F.Q., Siqueira, L.F.G. & Francisco, W. - WIM - 35213, um novo antimicrobiano no tratamento da gonorréia aguda. F. Méd (BR), 83:337-344, 1981.

Tabela 2 - Associação entre CIM da penicilina G, para 174 linhagens de *N. gonorrhoeae*, com o sorogrupo.

Símbolos: * = Os números entre parênteses são percentuais

CIM ($\mu\text{g/ml}$)	Nº EX.	Sorogrupo	
		IA	IB
0,03	5	3 (60)	2 (40)
0,06	13	6 (46)	7 (54)
0,12	62	20 (32)	42 (68)
0,25	48	15 (31)	33 (69)
0,5	22	3 (14)	19 (86)
1	22	0 (0)	22 (100)
2	2	0 (0)	2 (100)

3. Bygdeman, S. - Antibiotic susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* in relation to serogroups. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B*, 89:227-237, 1981.
4. Cohen, M.S.; Cooney, M.H.; Blackman, E. & Sparling, P.F. - In vitro antimicrobial susceptibility of penicillinase producing and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 24:597-599, 1983.
5. Faruki, H.; Komescher, R.N.; McKinney, W.P. & Sparling, P.F. - A community-based outbreak of infection with penicillin-resistant *Neisseria gonorrhoeae* not producing penicillinase (chromosomally mediated resistance). *N. Engl. J. Med.*, 313:607-611, 1985.
6. Grunder, K. & Petzoldt, D. - Sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to spectinomycin and thiamphenicol. *Br. J. Vener. Dis.*, 56:252-254, 1980.
7. Judson, F.N. - The importance of coexisting syphilitic, chlamydial, mycoplasmal, and trichomonal infections in the treatment of gonorrhea. *Sex. Transm. Dis.*, 6(Suppl):112-118, 1979.
8. Karney, W.W.; Pederson, A.H.B.; Nelson, M.; Adns, H.; Feifer, P.R.t. & Holmes, K.K. - Spectinomycin versus tetracycline for the treatment of gonorrhoea. *N. Engl. J. Med.*, 296:889-894, 1977.
9. Martin, J.E.; Lester, A.; Prince, E.V. & Schmale, J.D. - Comparative study of gonococcal susceptibility to penicillin in the United States, 1955-1969. *J. Infect. Dis.*, 122:459-461, 1970.
10. Members of the Australian Gonococcal Surveillance Programme - Penicillin sensitivity of gonococci in Australia: development of australian gonococcal surveillance programme. *Br. J. Vener. Dis.*, 60:226-230, 1984.
11. NG., W.S; Anton, P. & Arnold, K. - *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Hong Kong: in vitro susceptibility to 13 antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 19:12-17, 1981.
12. O'Callaghan, C.H.; Morris, A.; Kirby, S.M. & Schindler, A.H. - Novel method for detection of B-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1:283-288, 1972.
13. Perine, P.L.; Morton, R.S.; Piot, P.; Siegel, M.S. & Antal, G.M. - Epidemiology and treatment of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex. Transm. Dis.*, 6(Suppl):152-158, 1979.
14. Phillips, I. - B-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *Lancet*, 2:656-657, 1977.
15. Reyn, A.; Korner, B. & Bentzon, M. - Effects of penicillin, streptomycin and tetracycline on *N. gonorrhoeae* isolated in 1944 and 1957. *Br. J. Vener. Dis.*, 34:227-230, 1958.
16. Rice, R.J.; Biddle, J.W.; Jeanlouis, Y.A.; Dewitt, W.E.; Blount, J.H. & Morse, S.A. - Chromosomally mediated resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the United States: results of surveillance and reporting, 1983-1984. *J. Infect. Dis.*, 153:340-345, 1986.
17. Rodriguez, J.; Chieza, Z.F.; Ronda, C.H.R.; Kouri, Y.; Cuevas, R.; Nevares, M. & Pirez, M. - In vitro susceptibility of 50 non-B-lactamase-producing *Neisseria gonorrhoeae* strains to 12 antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23:242-244, 1983.
18. Shahmanesh, M.; Shukla, S.R.; Phillips, I.; Westwood, A. & Thin, R.N. - Ciprofloxacin for treating urethral gonorrhoea in men. *Genitourin. Med.*, 62:86-87, 1986.
19. Siegel, S. - Non parametric statistics for the behavioral sciences. Tokyo, McGraw-Hill Book, 1965.
20. Sparling, P.F.; Sarubbi Jr, F.A. & Blackman, E. - Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Bacteriol.*, 124:740-749, 1975.
21. Tupasi, T.E.; Crisologo, L.B.; Torres, C.A.; Calubiran, O.V. & de Jesus, I. - Cefuroxime, thiamphenicol, spectinomycin, and penicillin G in uncomplicated infections due to penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Br. J. Vener. Dis.*, 59:172-175, 1983.
22. Young, H. - Cultural diagnosis of gonorrhoea with modified New York City (MNJC) medium. *Br. J. Vener. Dis.*, 54:36-40, 1978.

AEROMONAS HYDROPHILA E PSEUDOMONAS AERUGINOSA ISOLADAS DE CASO DE ESTOMATITE EM BOTHROPS ALTERNATUS (SERPENTE, VIPERIDAE)*

Marcio Hipolito

Seção de Bacteriologia Animal
Instituto Biológico
Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252
04014 São Paulo SP, Brasil

Sofia Calixto Mavridis

Seção de Venenos
Instituto Butantan
Av. Vital Brazil, 1500
05504 São Paulo SP, Brasil

Lucia Baldassi

Aurélia Archanja Procaci Moulin
& Maria Luisa Barbosa

Seção de Bacteriologia Animal

Instituto Biológico

Resumo

A extração de venenos de serpentes, associada ao "stress" ocasionado pela manutenção desses animais em cativeiro, são fatores importantes na predisposição à estomatite necrótica. A espécie *Aeromonas hydrophila* tem sido frequentemente isolada como agente etiológico desta doença e a *Pseudomonas aeruginosa* é considerada um agente oportunista encontrado comumente em várias doenças de animais de sangue frio em particularmente, neste. Neste artigo, os autores descrevem o isolamento de *Aeromonas hydrophila* e *Pseudomonas aeruginosa*, a partir de exsudato de lesões orais, de estomatite necrótica em serpente *Bothrops alternatus* (urutu-cruzeiro) mantida em cativeiro e utilizada como doadora de veneno, visando a produção de anti-soro para tratamento em casos de acidentes ofídicos.

Summary

Aeromonas hydrophila and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from stomatitis in *Bothrops alternatus* (Serpente, Viperidae)

Poisson extraction from captive snakes cause very often mucosal lesions which together with the stress originated by their living conditions may be important factors involved in the aetiology of the necrotic stomatitis - mouth rot. *Aeromonas hydrophila* has been frequently recovered as the main agent responsible for the disease and *Pseudomonas aeruginosa* is considered an opportunist bacterium commonly found in several animal diseases, including necrotic stomatitis in captive snakes. In the paper, the authors

*Trabalho apresentado no 11º Encontro de Pesquisas Veterinárias, 6 e 7 de Novembro de 1986, FCVA, UNESP, Jaboticabal, SP.

describe the isolation of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas aeruginosa* from the exsudate of oral lesions of necrotic stomatitis in a brazilian snake, *Bothrops alternatus* (urutu - cruzeiro) mantained captive and used as poison donor for the production of antiserum for treatment in cases of ophidian accident.

Introdução

As serpentes mantidas em cativeiro, são a única fonte para a obtenção de venenos, matéria prima utilizada na produção de soros anti-ofídicos.

O cativeiro, para um grande número de serpentes peçonhentas não traduz todas as suas necessidades, o que dificulta a adaptação do animal, ocasionando-lhe um constante estado de "stress". À esta condição, somam-se outros fatores como a retirada do animal de seu habitat, o processo de captura e o transporte em caixas de madeira lacradas, onde estas, em geral, permanecem durante dias até a chegada ao seu destino.

O ambiente artificial determina mudanças no mecanismo fisiológico das serpentes e quando não adequado, provoca alterações comportamentais (6) como apatia, anorexia e consequente perda de peso, queda da resistência (9), deficiências nutricionais, ocasionando assim maior fragilidade da mucosa bucal, além de altos índices de morbidade e mortalidade (1, 5, 8, 22).

A manobra de extração de veneno, associada a estas condições, pode provocar soluções de continuidade na mucosa oral, inicialmente com discreta hemorragia, favorecendo a invasão bacteriana e provocando as estomatites. Da lesão inicial instalada a doença pode comprometer toda a cavidade bucal e chegar à necrose (mouth rot); ou ainda se disseminar por outros órgãos como esôfago e pulmão, comprometendo-os seriamente ou provocar septicemias (1, 13).

Aeromonas hydrophila já foi citada na literatura como agente primário de estomatite necrótica em serpentes independentemente da presença de lesões bucais (17). Também é citada como responsável pela septicemia hemorrágica dos ofídios transmitida por ácaros (*Ophionyssus serpentis*) (4), além de ser o agente da doença de anfíbios conhecida como "red leg disease" (12, 18, 21) e também ter sido isolada em caso de úlceras em peixes (10).

A presença da *Pseudomonas aeruginosa*, como bactéria oportunista, já foi relatada entre nós em caso ocorrido em serpente doadora de veneno *Bothrops neuwiedi* (14).

A presente notificação, primeira em nosso meio, deve-se ao isolamento da *Aeromonas hydrophila*, como agente primário de estomatite necrótica em *Bothrops alternatus*.

Os autores visam alertar sobre o amplo espectro de doenças causadas por esta bactéria em diversos grupos animais, tanto hetero como homeotermos, incluindo o homem (13).

Material e Métodos

O material recebido constou de exsudato oriundo de lesão bucal, coletado com auxílio de "swab" estéril. Foi semeado em tubos contendo caldo simples e em placas de Petri com os seguintes meios: ágar sangue de carneiro a 5%; ágar MacConkey e ágar cetremide (seletivo para *Pseudomonas*). Estes meios de cultura foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas. A partir do crescimento em caldo simples, foram realizadas novas semeaduras em placas de Petri contendo os três últimos meios citados e em seguida incubadas nas mesmas condições.

Do cultivo obtido em ágar cetremide realizaram-se novos repiques, também em ágar sangue, para detectar possíveis propriedades hemolíticas e dos diversos cultivos obtidos nos meios citados foram feitas provas bioquímicas.

Dos cultivos obtidos em ágar sangue prepararam-se esfregaços que foram a seguir corados pelo método de Gram, para a observação ao microscópio óptico.

Resultados

As placas que foram semeadas diretamente e a partir do caldo simples apresentaram crescimento bacteriano, revelando a presença de dois tipos distintos de colônias, tanto no ágar MacConkey, quanto no ágar sangue. Neste último, verificou-se que uma delas determinava nítido halo de hemólise total. No ágar cetremide, entretanto, proliferou um único tipo de colônia.

A bacterioscopia possibilitou evidenciar bastonetes delicados e Gram-negativos.

Os resultados do bioquímismo bacteriano encontram-se sumariados nas Tabelas 1, 2 e 3.

A interpretação dos resultados obtidos permitiu caracterizar que a colônia hemolítica tratava-se de *Aeromonas hydrophila* e o bioquímismo das colônias não hemolíticas, revelou tratar-se de um microrganismo cujo comportamento nestas provas era compatível com a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*.

Discussão

Aeromonas hydrophila é um agente patogênico reconhecido como capaz de atingir diferentes espécies de animais heterotermos, tais como peixes, anfíbios e répteis (15, 19, 20, 21, 22) e, em rãs, é o agente causal da doença da perna vermelha (red leg disease) (12, 18, 21).

A presença da *Pseudomonas aeruginosa* como agente causador de estomatites já foi citada entre nós (14). A literatura aponta esta bactéria geralmente como agente secundário nas infecções em répteis (19, 20). É válido ressaltar que a *Pseudomonas aeruginosa* é encontrada na flora bacteriana normal da cavidade oral de serpentes, sugerindo que a infecção por este agente está condicionada ao estado de saúde do hospedeiro, comportando-se, portanto, como agente invasor oportunista (7).

A mesma situação ocorre nos casos de *Proteus mirabilis* e *Streptococcus viridans*, fato já relatado em nosso meio, como agentes de estomatites em serpentes não peçonhentas (11).

Enquanto a *Pseudomonas aeruginosa* se coloca como agente de diversas doenças em

Tabela 1 - Provas de identificação bioquímica. (Sistema Bac-tray III Interlab-Difco)=

	Ágar MacConkey	Ágar cetremide
Hemólise (ágar sangue de carneiro)	+	-
Produção de oxidase	+	+
Crescimento em caldo cetremide	-	+
Utilização da acetamida, citrato e malonato como fontes de carbono	-	+
Acidificação da maltose	+	-
Hidrólise da esculina	+	-
Hidrólise da arginina	+	+
Hidrólise da uréia	-	-
Produção de indol	+	-
Conclusão:	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Tabela 2 - Provas complementares para a identificação de *Aeromonas hydrophila*. (Bergey's Manual, 1984)

Crescimento em ágar nutritivo a 37°C	+
Produção de pigmento em ágar King B	-
Acidificação da salicina; sacarose; arabinose; glicose; trealose; galactose; dextrina; lactose; amido e manitol	+
Acidificação da xilose; ramnose; dulcitol e inositol	-
Redução do nitrato a nitrito	+
Produção de catalase; Dnase e gelatinase	+
Produção de fenilalaninadescarboxilase	-
Produção de acetona (Voges-Proskauer)	+
Motilidade em gota pendente	+
Crescimento em caldo simples com 6,5% de NaCl	-

Tabela 3 - Provas complementares para a identificação de *Pseudomonas aeruginosa*. (Bergey's Manual, 1984)

Produção de pigmento em ágar King B	+
Solubilidade do pigmento em clorofórmio	+
Motilidade em gota pendente	+
Redução do nitrato a nitrito	+
Acidificação da glicose	+
Acidificação da xilose; trealose; arabinose; lactose; ramnose; salicina; galactose; inositol; sorbitol e amido	-
Produção da gelatinase	+
Crescimento em caldo BHI: a 41°C	+
a 4°C	-

répteis, a *Aeromonas hydrophila* não aparece na microbiota oral de serpentes (3, 7) e é também sabido que não necessita de prévia solução de continuidade da mucosa oral para promover a estomatite (17). A estomatite necrosante causada pela *Aeromonas hydrophila* é uma doença própria de animais mantidos em cativeiro, não tendo sido reportado até o momento, casos em serpentes de vida livre (16, 17).

A associação dessas duas bactérias, como no caso ora apresentado, é igualmente notificada por vários autores (5, 9, 15, 19) e caracteriza um papel patogênico consideravelmente maior na severidade da doença.

Instalada a estomatite, esta pode passar a um estado de cronicidade, que depende da resistência do organismo da serpente, ou pode evoluir para um processo agudo, quase sempre com uma septicemia, geralmente fatal.

O presente relato, assim como o de Belluomini & col., 1976/77, mostra que o manejo periódico para a extração de veneno e a síndrome de má adaptação em cativeiro (6), são fatores desencadeadores de processos patológicos bucais, onde bactérias se instalam, ocasionando frequentemente a morte destes animais.

Nossas observações no desenrolar do presente trabalho, permitiram constatar que a resposta ao tratamento de tais afecções, está diretamente relacionada à precocidade com que se estabelece o diagnóstico e a rápida instituição de um esquema terapêutico adequado.

O manejo eficiente, a higienização e desinfecção do biotério; a extração de veneno com a maxima assepsia possível e a constante observação dos animais são procedimentos que devem ser adotados para obtermos animais saudáveis em condições de serem utilizados na produção de venenos.

Referências Bibliográficas

1. Belluomini, H.E.; Saliba, A.M. & Abe, A.S. - Inquérito anátomo-patológico em serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Buthrops* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) Mem. Inst. Butantan, 40/41:123-128, 1976/77.
2. King, N.R. & Holt, J.G., eds. - *Bergey's manual*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984.
3. Burke, T.J.; Rosenberg, D. & Smith, A.R. - Infectious stomatitis: a perspective. Study of normal flora and report of an unusual case. In: - Annual Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, 1978, Knoxville, Tennessee, p.190-196, 1979.
4. Camin, J.H. - Mite transmission of a haemorrhagic septicemia in snakes. J. Parasitol., 34:345-354, 1948.
5. Cooper, J.E. & Leakey, J.H.E. - A septicaemic disease of East African snakes associated with Enterobacteriaceae. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 70:80-84, 1976.
6. Cowan, D.F. - Diseases of captive reptiles. J. Am. Vet. Med. Assoc., 153:848-859, 1968.
7. Draper, C.S.; Walker, R.D. & Lawler, H.E. - Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. J. Am. Vet. Med. Assoc., 179:1223-1226, 1981.
8. Goldstein, E.J.C.; Agyare, E.O.; Vagvolgyi, A.E. & Halpern, M. - Aerobic bacterial oral flora of garter snakes: development of normal flora and pathogenic potential for snakes and humans. J. Clin. Microbiol., 13:954-956, 1981.
9. Hess, J.L. & Rudy, R.L. - Ulcerative stomatitis in the Python. Vet. Med. Small Anim. Clin., 69:1379-1381, 1974.
10. Hutzling, H.W.; Esch, G.W. & Hazem, T.C. - Histopathology of red-sore disease (*Aeromonas hydrophila*) in naturally and experimentally infected largemouth bass *Micropterus salmoides* (Lacépède). J. Fish Disease, 2:263-277, 1979.
11. Iizuka, H.; Canter, H.M.; Oliveira, E.P.T.; Higashi, H.G. & Rolim Rosa, R. - Estomatite ulcerativa infecciosa em *Boa constrictor constrictor* mantidas em cativeiro. Mem. Inst. Butantan, 47/48:113-120, 1983/84.
12. Kulp, W.L. & Borden, D.G. - Further studies on *Proteus hydrophilus*, the etiological agent in "red leg" disease of frogs. J. Bacteriol., 42:673-685, 1942.

13. Marcus, L.C. - Infectious diseases of reptiles. J. Am. Vet. Med. Assoc., 159:1626-1631, 1971.
14. Mavridis, S.C.; Baldassi, L.; Moulin, A.A.P. & Hipolito, M. - *Pseudomonas aeruginosa* como agente causal de abcesso em serpente (*Bothrops neuwiedi*). Rev. Microbiol. (São Paulo), 17:28-30, 1986.
15. Mayer, H. & Frank, W. - Bacteriological investigations on reptiles and amphibians. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A, 229:470-481, 1974.
16. Murthy, T.S.N. & Rao, K.V.R. - On "mouth-rot" disease in the captive sea snakes. The Snake, 9:29-30, 1977.
17. Page, L.A. - Experimental ulcerative stomatitis in King snakes. Cornell Vet., 51:258-266, 1961.
18. Russell, F.H. - An epidemic septicemic disease among frogs due to the *Bacillus hydrophilus fuscus*. J. Am. Med. Assoc., 30:1442-1449, 1898.
19. Selbitz, H.J. & Elze, K. - *Aeromonas* and *Pseudomonas* infection of reptiles. Monatsh. Veterinaermed., 37:293-295, 1982.
20. Shotts, E.B.; Caines, J.L.; Martin, L. & Prestwood, A.K. - *Aeromonas* induced deaths among fish and reptiles in an Eutrophic inland lake. J. Am. Vet. Med. Assoc., 161:603-607, 1972.
21. The Merck Veterinary Manual. 4.ed. Rahway, Merck & Co., 1978.
22. Wallach, J.D. - Medical care of reptiles. J. Am. Vet. Med. Assoc. 155:1017-1034, 1969.

NEISSERIA GONORRHOEAE PRODUTORA DE PENICILINASE NO RECIFE, BRASIL*

Marcelo Magalhães

Deptº de Medicina Tropical
 Centro de Ciências da Saúde
 Universidade Federal de Pernambuco
 Cidade Universitária
 50739 Recife PE, Brasil

Resumo

Embora linhagens de *Neisseria gonorrhoeae* produtoras de penicilinase (NGPP) fossem primeiramente reconhecidas no Recife desde maio de 1983, a incidência permaneceu baixa (0,6%) até março de 1986 quando aquela proporção elevou-se rapidamente atingindo 8,3%. Tal aumento foi atribuído à introdução de uma nova cepa de NGPP, pertencente ao sorogrupo IB, na comunidade. Coincidencialmente, como resultado de modificações na política econômica, o tratamento da gonorreia com drogas beta-lactamase resistentes foi prejudicado facilitando a disseminação daquela cepa resistente. A maioria das NGPP (95%) isoladas durante esse estudo abrigavam o plasmídio de 4,7Mdal sem o plasmídio conjugativo, e 80% das isoladas em 1986 pertenceram ao sorogrupo IB. Todas as NGPP foram sensíveis ao tianfenicol, espectinomicina, rosoxacina e cefotaxima, porém exigiram concentrações inibitórias mínimas maiores que as linhagens penicilina suscetíveis.

Summary

Penicillinase producing Neisseria gonorrhoeae in Recife, Brazil

Though penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) were first recognized in Recife since May 1983, the incidence remained low (0.6%) until March 1986 when that proportion rose rapidly to reach 8.3%. Such increase was attributed to the introduction of a new PPNG strain, belonging to serogroup IB, in the community. Incidentally, as a result of changes in the economic policy, the treatment of gonorrhoea with beta-lactamase resistant drugs was impaired facilitating the spread of that resistant strain. Most PPNG (95%) isolated during this study harboured the 4.7Mdal plasmid without the transfer plasmid, and 80% of those recovered in 1986 belonged to serogroup IB. All PPNG were sensible to thiampenicol, spectinomycin, rosoxacin and cefotaxime, but they required greater minimal inhibitory concentrations than the penicillin susceptible strains.

Introdução

Em 1976, a história da penicilina resistência entre as bactérias foi

*Trabalho financiado pelo CNPq (Processo nº 405.101/85).

revolucionada quando, simultaneamente, na Inglaterra (20) e Estados Unidos (2), as primeiras linhagens de *Neisseria gonorrhoeae* produtoras de penicilinase (NGPP) foram reconhecidas. Um ano depois, 15 países relatavam 397 casos de infecção por NGPP à Organização Mundial da Saúde (26), e verifica-se que a síntese da enzima é governada pela presença alternativa de dois tipos de plasmídios Pc^r , um de 4,4 a 4,7Mdal, e um outro de 3,2 a 3,4Mdal. Mais recentemente, um novo plasmídio Pc^r , de peso molecular intermediário, foi isolado na França (8).

A maneira de como o gonococo adquiriu seus plasmídios Pc^r é controversa (19, 22, 24). Com certeza sabe-se, apenas, que eles são relacionados geneticamente e possuem 40% da sequência transponível de *Tn2*, um transponon que inclui o gene bla, responsável pela produção de uma beta-lactamase tipo TEM-1 (5, 7, 10).

O reconhecimento de plasmídios Pc^r nos gonococos proporcionou o temor generalizado de que as NGPP logo se espalhariam e predominariam no mundo. Isso já é uma realidade no Extremo Oriente e África onde se têm encontrado índices entre 40 e 87% (16, 25). No Brasil, salvo inquéritos limitados realizados em Brasília, quando se observou frequência de NGPP em torno de 5% (Franchise, M. - comunicação pessoal), e da publicação de casos esporádicos ocorridos no Recife (12) e São Paulo (11), pouco se sabe a respeito desse importante problema epidemiológico. Isso estimulou o presente trabalho que relata a evolução da resistência plasmídica à penicilina, entre linhagens clínicas de gonococos isolados no Recife no período de 1983 a 1986.

Material e Métodos

Coleção das culturas de NGPP - Entre janeiro de 1983 e outubro de 1986, foram isoladas no Recife, em laboratório privado de microbiologia, 996 culturas de *N. gonorrhoeae*. Todas foram testadas para produção de beta-lactamase pelo método da cefalosporina cromogênica (17). As culturas reagentes foram suspensas em 0,2ml de sangue desfibrinado de coelho e conservadas a -70°C para estudo posterior. Os pacientes que forneceram culturas de NGPP foram inquiridos a respeito de viagens recentes, hábitos sexuais e provável fonte de contágio.

Identificação das NGPP - Todas as culturas produtoras de beta-lactamase foram confirmadas como *N. gonorrhoeae*: se constituídas por diplococos Gram negativos, se reativas aos testes da oxidase e catalase e se produziram a prolil-aminopeptidase ao teste Gonocheck II (E.Y. Laboratories).

Testes de sensibilidade - Foram realizados pelo método das diluições em ágar. Os detalhes técnicos foram descritos anteriormente (13). Por outra parte nos testes à ampicilina utilizou-se o método da difusão em ágar (3). Com o propósito de se obter dados comparativos, incluiram-se, nos testes de sensibilidade à tetraciclina, tianfenicol, espectinomicina, rosoxacina e cefotaxima, 16 linhagens de gonococos penicilina sensíveis, isto é, culturas que exigiram uma concentração inibitória mínima (CIM) $\leq 0,06\mu g/ml$.

Grupamento sorológico - As linhagens de NGPP foram classificadas nos grupos IA (VI) ou IB (VII, VIII) através da coaglutinação, empregando-se anticorpos monoclonais obtidos comercialmente (Pharmacia). Na realização dos testes obedeceram-se instruções do fabricante.

Isolamento e caracterização dos plasmídios - As culturas de NGPP foram cultivadas em meio GC (Difco), adicionado de Suplemento II (Merck) a 1% e 5 $\mu g/ml$ de ampicilina, durante 14 a 16h, e o crescimento bacteriano suspenso em tampão Tris acetato 40mM-EDTA2mM, pH 8. As suspensões bacterianas foram submetidas à extração alcalina (4) e a caracterização física dos plasmídios realizada através de análise eletroforética em gel de agarose (14).

Resultados

Das 996 culturas submetidas ao teste da cefalosporina cromogênica, 29 (2,9%) foram reagentes. Desses estíries, 86% foram isoladas da uretra de pacientes heterossexuais masculinos e 14% da cérvice uterina. Nenhum desses pacientes havia estado fora do Recife, nos 20 dias que antecederam o início dos sintomas. Oitenta por cento dos pacientes masculinos atribuíram o contágio a intercurso com prostitutas.

Os percentuais de isolamento das NGPP, de acordo com o ano de ocorrência, estão condensados na Tabela 1. No ano de 1986, observou-se o mais elevado índice de frequência (8,3%).

Os resultados do sorogrupoamento das NGPP estão expostos, também, na Tabela 1. Vinte cepas (6%) pertencem ao sorogrupo IB, porém todas as quatro linhagens, isoladas antes de 1986, foram do sorogrupo IA.

Dentre 20 linhagens de NGPP, submetidas à análise eletroforética, 19 (95%) possuíam o plasmídio Pcr de 4,7Mdal, todas o plasmídio criptico de 2,7Mdal, uma o plasmídio Pcr de 3,4Mdal e, nenhuma o plasmídio conjugativo de 24Mdal. A Figura 1 representa a corrida eletroforética das primeiras linhagens de NGPP isoladas no Recife e de duas estíries penicilina sensíveis, uma delas portando o plasmídio conjugativo.

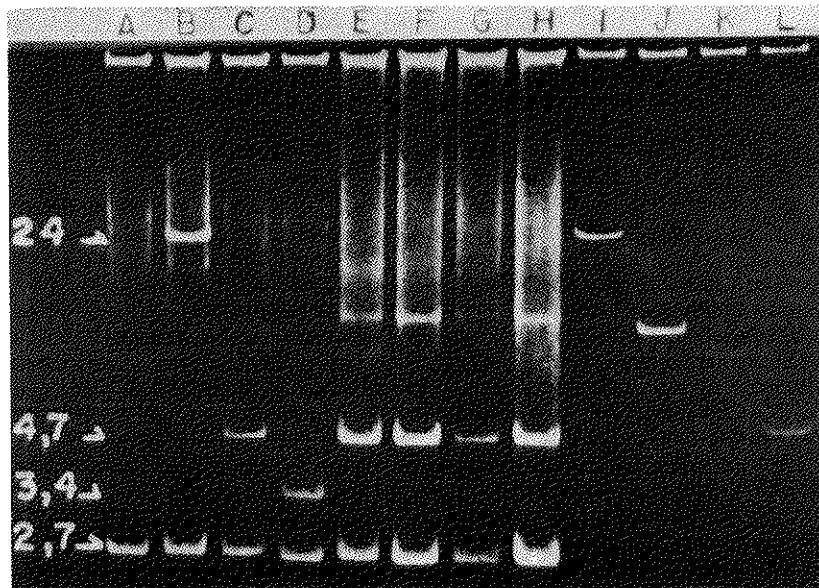
No que concerne aos testes de sensibilidade, todas as cepas de NGPP exigiram uma CIM de penicilina G superior a 2 μ g/ml e não mostraram qualquer halo de inibição,

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose dos plasmídios de *N. gonorrhoeae* e dos plasmídios padrões.

Símbolos: Canal A: Cepa selvagem apresentado apenas o plasmídio criptico de 2,7 Mdal. Canal B: Cepa selvagem exibindo, também, o plasmídio conjugativo de 24 Mdal. Canal C, E, F, G, H: NGPP abrigando os plasmídios Pcr de 3,4 Mdal. Canal D: NGPP com o plasmídio Pcr de 3,4 Mdal. Canais I, J, K, L: Plasmídios padrões. Análise realizada pelo Dr. Diógenes Santos, Porto Alegre

Tabela 1 - Ocorrência e sorogrupoamento de 29 cepas de NGPP de acordo com o ano de isolamento

Ano	Nº Ex.	NGPP	Sorogrupo	
			IA	IB
1983	216	3 (1,4%)	3 (100%)	0
1984	230	1 (0,4)	1 (100%)	0
1985	250	0	—	—
1986	300	25 (8,3%)	5 (20%)	20 (80%)



quando testadas frente aos discos contendo 10 μ g de ampicilina. A Tabela 2 mostra os resultados dos testes de sensibilidade das linhagens penicilina sensíveis e de NGPP a cinco drogas antigonocócicas alternativas. As NGPP foram menos susceptíveis a essas drogas que as linhagens penicilina sensíveis.

Tabela 2 – Sensibilidade comparativa entre linhagens de *N. gonorrhoeae* penicilina sensíveis e de NGPP a cinco drogas antibacterianas

Antibacteriano	Sensíveis (n= 16)			NGPP (n= 24)		
	CIM (μ g/ml)		Variação	CIM (μ g/ml)		Variação
	50	90		50	90	
Tetraciclina	0,12 - 1	0,35	0,57	0,5 - 4	0,6	2
Tianfenicol	0,25	0,25	0,25	1	1	1
Espectinomicina	6,25 - 25	9,4	21,9	6,25 - 25	14,4	22,5
Roxoxacina	0,008 - 0,016	0,008	0,014	0,008 - 0,032	0,016	0,029
Cefotaxima	0,002 - 0,004	0,002	0,003	0,002 - 0,016	0,006	0,014

Discussão

No Recife, a primeira linhagem de NGPP foi isolada em maio de 1983 (12), mas não se pôde determinar a época exata em que surgiram devido à inexistência de investigações anteriores sobre o assunto. Assim, embora detectadas há alguns anos, as NGPP encontraram dificuldades em se implantar e disseminar-se. Situação surpreendente quando comparada ao que ocorreu em determinadas cidades da Ásia (25) e África (16), onde o espalhamento das NGPP foi explosivo. As cidades do Terceiro Mundo partilham idênticos problemas médico sociais, tais como: prostituição tolerada, venda de antibióticos sem prescrição e ausência de serviços de saúde capazes de rastrear os casos novos de gonorréias penicilina resistentes e seus contatos.

Aqui, e provavelmente em outras cidades brasileiras, a maioria dos casos de gonorréia é primariamente vista nas farmácias e tratada com o esquema ampicilina e probenicide. Porém, quando há falha terapêutica, ou mesmo como primeira opção, é corriqueiro o uso de outras drogas antimicrobianas (tianfenicol, espectinomicina, rosoxacina, gentamicina e tetraciclina). Nesta conexão, verificou-se recentemente em Porto Alegre, em resposta a consultas simuladas, que 88% dos balconistas de farmácias indicam terapêuticas antimicrobiana para seus clientes (23). Desse modo, contrariando o que é historicamente aceito para os países em desenvolvimento, a respeito de outros sistemas droga microrganismo (15), a ampla utilização de quimioterapia antigonorréica alternativa da penicilina poderia ser fator limitante e não estímulo ao espalhamento das NGPP. Isso é corroborado pelo exemplo da França, onde a substituição da penicilina G, por outros medicamentos, no tratamento inicial da gonorréia, foi responsabilizada pelo retardamento de implantação daquelas linhagens (21).

A manutenção na natureza de estirpes bacterianas portadoras de plasmídios R é facilitada pela pressão seletiva e constante de agentes antimicrobianos (1). Essa assertiva é indiscutivelmente válida com referência às enterobactérias e pseudomonas cujos plasmídios R governam resistência a múltiplas drogas. Por outra parte, os gonococos abrigam único plasmídio P^c, conferindo resistência somente à penicilina. Desse modo, se agentes antigonorréicos eficazes e beta-lactamase resistentes são constantemente oferecidos à coletividade, as chances de eliminação das NGPP são idênticas a das linhagens sensíveis. Isso explicaria o que estava acontecendo no Recife até 1986, quando houve súbita elevação nos índices de isolamento das NGPP. Coincidetemente, esse surto iniciou-se após o carnaval, época em que milhares de turistas visitam o Recife, e houve a implantação do chamado Plano Cruzado, medida econômica responsável pelas dificuldades em se adquirir

variados bens de consumo, inclusive as drogas antigenocócicas beta-lactamase resistentes. Portanto, é possível que, em março de 1986, tenha sido introduzida na comunidade uma nova cepa de NGPP dotada de elevada transmissibilidade. De fato, todas as cepas detectadas em 1986 apresentaram idêntico modelo plasmídico e 80% delas pertenceram ao sorogrupo IB, sorogrupo não encontrado, até então, entre as NGPP isoladas no Recife. É provável, ainda, que o espalhamento dessa recém introduzida linhagem houvesse sido facilitada pela diminuição da oferta das drogas antigenocócicas alternativas da penicilina.

Embora os testes de sensibilidade evidenciassem que as NGPP exigiram CIMs 50 e 90, de várias drogas antigenocócicas alternativas, superiores às requeridas pelas cepas penicilina sensíveis, as CIMs estiveram muito abaixo das concentrações críticas que distinguem as cepas clinicamente resistentes. A exigência de CIMs mais elevadas indica, também, que as linhagens de NGPP, circulantes no Recife, além da resistência plasmídica, possuem ainda um certo grau de penicilina resistência cromossomicamente mediada. As linhagens de *N. gonorrhoeae* cromossomicamente resistentes são menos sensíveis a outras drogas antimicrobianas, estruturalmente relacionadas à penicilina (6, 9, 13, 18). Se os atuais índices de isolamento de NGPP persistirem ou aumentarem, e se é levada em consideração a taxa de frequência de 13% de gonorreia cromossomicamente resistentes (13), a posição da penicilina, como droga de escolha no tratamento de gonorréia, é questionável no Recife.

Referências Bibliográficas

1. Anderson, E.S. - The ecology of transferable drug resistance in enterobacteria. Ann. Rev. Microbiol., 22:131-180, 1986.
2. Ashford, W.A.; Golash, R.G. & Hemming, V.G. - Penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Lancet, 2:657-658, 1976.
3. Biddle, J.W.; Jeanlouis, Y. & McGlohn, M.S. - Detection of clinically significant antimicrobial resistance in gonococci by agar-disc diffusion. In: - Schoolnik, G.K., ed. - The pathogenic *Neisseriae*. Washington, D.C., Am. Soc. Microbiol., p.107-115, 1985.
4. Birboim, H.C. & Doly, J. - A rapid alkaline extraction procedure for screening plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7:1513-1522, 1979.
5. Cannon, J.G. & Sparling, P.F. - The genetic of the gonococcus. Ann. Rev. Microbiol., 38:111-133, 1984.
6. Cohen, M.S.; Cooney, M.H.; Blackman, E. & Sparling, P.F. - In vitro antimicrobial susceptibility of penicillinase-producing and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae* strains. Antimicrob. Agents Chemother., 24:597-599, 1983.
7. Fayet, O.; Fromet, Y. & Piffaretti, J.C. - Reconstitution of a functional *Tn3*-like transposon from a *Neisseria gonorrhoeae* plasmid sequence specifying B-lactamase synthesis. In: - Periti, P. & Grassi, G.G., eds. - Current chemotherapy and immunotherapy. Washington, D.C., Am. Soc. Microbiol., p.206-208, 1981.
8. Gouby, A.; Bourg, G. & Ramuz, M. - Previously undescribed 6.6 kilobase R plasmid in penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. Antimicrob. Agents Chemother., 29:1095-1097, 1986.
9. Grunder, K. & Petzoldt, D. - Sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to spectinomycin and thiampenicol. Br. J. Vener. Dis., 56:252-254, 1980.
10. Hefron, F.; Sublet, R. & Hedges, R.W. - Origin of the TEM beta-lactamase gene found on plasmids. J. Bacteriol., 122:250-256, 1975.
11. Lombardi, C.; Siqueira, L.F.G.; Santos Jr., M.F.Q.; Francisco, W. & Belda, W. - *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase: primeira cepa isolada em São Paulo, SP (Brasil). Rev. Saúde Públ. (S. Paulo), 19:374-376, 1985.
12. Magalhães, M. - Uretrite causada por *Neisseria gonorrhoeae* produtora de penicilinase: relato de um caso. Rev. Bras. Patol. Clin., 20:116-118, 1984.
13. Magalhães, M. - Resistência cromossómica à penicilina em *Neisseria gonorrhoeae*. Rev. Microbiol., (S. Paulo), 18(3), 1987.

14. Meyers, J.A.; Sanchez, D.; Elwell, L.P. & Falcow, S. - Simple agarose electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127:1529-1537, 1976.
15. Murray, B.E.; Alvarado, T.; Kim, K.H.; Vorachit, M.; Jaynetra, P.; Levine, M.M.; Prenzel, I.; Fling, M.; Elwell, L.; MacCracken, G.H.; Madrigal, G.; Odio, C. & Trabulsi, L.R. - Increasing resistance to trimethoprim-sulfamethoxazol among isolates of *Escherichia coli* in developing countries. *J. Infect. Dis.*, 152:1107-1113, 1985.
16. Obasiki-Ebor, E.F.; Oyaide, S.M. & Okpere, E.E. - Incidence of penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* (PPNG) strains and susceptibility of gonococcal isolates to antibiotics in Benin City, Nigeria. *Genitourin. Med.*, 61:367-370, 1985.
17. O'Callaghan, C.H.; Morris, A.; Kirby, S.M. & Schindler, A.H. - Novel method for detection of B-lactamase by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, 1:283-288, 1972.
18. NG, W.S.; Anton, P. & Arnold, K. - *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Hong Kong: in vitro susceptibility to 13 antibiotics. *Antimicrobiol. Agents Chemother.*, 19:12-17, 1981.
19. Perine, P.L.; Morton, R.S.; Pict, P.; Siegel, M.S. & Antal, G.M. - Epidemiology and treatment of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Sex. Transm. Dis.*, 6(Suppl):152-158, 1979.
20. Phillips, I. - B-lactamase-producing, penicillin-resistant gonococcus. *Lancet*, 2:656-657, 1976.
21. Ricu, J.Y.; Martin, P.M.V. & Guibourdenche, M. - Epidemiological survey of beta-lactamase-producing gonococci in France, May 1979 to September 1984. In: - Schoolnik, G.K., ed. - *The pathogenic Neisseriae*. Washington, D.C., Am. Soc. Microbiol., p.92-95, 1985.
22. Siegel, S.M.; Perine, P.L.; Westbrook, W.G. & de Jesus, I. - Epidemiology of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. In: - Brooks, G.F.; Gotschlich, E.C.; Holmes, K.K.; Sawyer, W.D. & Young, F.E., eds. - *Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae*. Washington, D.C., Am. Soc. Microbiol., p.75-79, 1978.
23. Soibelman, M.; do Amaral, L.R.; Polmini, A.L.F.; Lerrer, D.P. & Leite, S.S. - Indicação de medicamentos por balconistas de farmácia em Porto Alegre, RS. *Rev. Ass. Med. Brasil.*, 32:79-83, 1986.
24. Sparling, P.F.; Sox, T.E.; Mohammed, W. & Guymon, L.F. - Antibiotic resistance in the gonococcus: diverse mechanisms of coping with hostile environment. In: - Brooks, G.F.; Gotschlich, E.C.; Holmes, K.K.; Sawyer, W.D. & Young, F.E., eds. - *Immunobiology of Neisseria gonorrhoeae*. Washington, D.C., Am. Soc. Microbiol., p.44-52, 1978.
25. Tupasi, T.E.; Calubiran, O.V. & Torres, C.A. - Single oral dose of cefaclor for the treatment of infections with penicillinase-producing strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Br. J. Vener. Dis.*, 58:176-179, 1982.
26. World Health Organization - *Neisseria gonorrhoeae* producing B-lactamase (penicillinase). *Weekly Epidemiologic Record*, 52:357-358, 1977.

OCORRÊNCIA DE YERSINIA SP. EM REDUTOS AQUÁTICOS NATURAIS, NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO

Angela Corrêa de Freitas

Marly Paiva Nunes

& Ilvan Delgado Ricciardi

Laboratório de Zoonoses

Instituto de Microbiologia da UFRJ

Caixa Postal 68040

21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Foram estudadas oito coleções aquáticas naturais obtidas na cidade do Rio de Janeiro, objetivando o isolamento de *Yersinia* sp. Em sessenta e quatro amostras de água processadas, vinte e seis (42,2%) mostraram-se positivas para a presença de *Yersinia* sp. proporcionando o isolamento de 55 amostras que foram classificadas em quatro diferentes espécies: *Y. intermedia* (61,8%), *Y. enterocolitica* (18,2%), *Y. frederiksenii* (16,3%) e *Y. kristensenii* (3,6%). As amostras de *Yersinia* sp. isoladas foram grupadas em biotipos, sorotipos e lisotipos, tendo sido encontrado entre elas o sorotipo O:5 implicado em infecções humanas na cidade do Rio de Janeiro. A pesquisa do potencial patogênico das amostras isoladas foi realizada através da detecção de enterotoxina termoestável (ST), da capacidade de autoaglutinação e da dependência ao íon cálcio. Em sua maioria, as amostras de *Yersinia* sp. mostraram-se avirulentas frente as três provas estudadas.

Summary

Occurrence of Yersinia sp. in natural aquatic resources of Rio de Janeiro city

Eight natural aquatic collections obtained in Rio de Janeiro were investigated aiming the isolation of *Yersinia* sp. of sixty four water samples studied 26 (42,2%) were positive for *Yersinia* sp. providing 55 strains classified as *Y. intermedia* (61,8%), *Y. enterocolitica* (18,2%), *Y. frederiksenii* (16,3%) and *Y. kristensenii* (3,6%). *Yersinia* isolates were grouped according to bio, sero and lisotypes. Serotype O:5 which has been associated to human infections in Rio de Janeiro was identified among *Y. enterocolitica* strains. Investigation of potential pathogenic properties of the isolates included the detection of ST toxin, autoagglutination capacity and calcium dependency. Most of the strains were shown to be non-virulent according to these tests.

Introdução

O gênero *Yersinia* ocupa, na atualidade, uma destacada posição dentro da família Enterobacteriaceae, em virtude de reunir espécies de importância médica relacionadas a uma variedade de manifestações clínicas, particularmente gastroenterite. A epidemiologia das infecções humanas causadas por *Y.*

enterocolitica, *V. intermedia*, *V. frederiksenii* e *V. kristensenii* ainda não está totalmente definida. Publicações recentes, porém, demonstram que estes microrganismos estão amplamente disseminados no meio animal e aquático (16, 17, 22, 33, 36) entre humanos diarreicos e/ou aparentemente normais (25, 27, 29, 35) e em alimentos (27, 31).

O ambiente aquático assume, dentro destas variáveis, considerável importância pelo possível papel de reservatório e veículo de transmissão de yersinioses, principalmente devido ao consumo de águas contaminadas por *V. enterocolitica*.

As limitações nas investigações da presença e distribuição de *Yersinia* sp. em redutos aquáticos naturais na cidade do Rio de Janeiro, motivaram o desenvolvimento do presente trabalho, bem como o estudo da possível habilidade patogênica das amostras isoladas.

Material e Métodos

Origem e processamento das amostras de água analisadas - Foram utilizadas amostras de água obtidas em oito locais de coleta de modo a formarem gradientes de poluição e de salinidade. Quatro dos locais (córregos e rios) encontram-se situados ao longo do rio Cachoeira, que nasce no Parque Nacional da Tijuca e finda no Alto da Boa Vista; um na Lagoa da Tijuca; outro nas águas oceânicas da Barra da Tijuca e os dois últimos no estuário poluído que circunda a Ilha do Fundão.

As amostras de água coletadas foram devidamente analisadas quanto aos parâmetros físico-químicos de temperatura, pH e salinidade (34) e quanto a análise dos índices colimétricos para a determinação de poluição fecal, utilizando-se a técnica do Número Mais Provável (NMP) (1).

Método de isolamento e identificação presuntiva das amostras de *Yersinia* sp. obtidas - A técnica utilizada no isolamento de *Yersinia* sp. a partir das águas coletadas foi determinada após estudo comparativo entre o método de filtração em membrana Millipore de poro H.A. 0,45µm, diâmetro 47mm (Millipore Filter Corporation Belford, MA, USA) e o método de centrifugação a 16.300g por 10 min a 4°C (37).

Os estudos revelaram como melhor método a técnica de centrifugação (15). Assim, as amostras de água foram centrifugadas e seus sedimentos enriquecidos em caldo sorbitol-bile-peptona (43), incubados por 21 dias a 4°C. Após este período, realizou-se o plaqueamento em ágar Mac Conkey e ágar desoxicolato citrato (BBL) incubados a 25°C por 48 horas. As colônias crescidas, suspeitas de pertencerem ao gênero *Yersinia*, foram identificadas por provas bioquímicas convencionais (38, 39), complementadas pelo sistema API 20E (Analytab Products, Inc).

Classificação das amostras de *Yersinia* sp. em biotipos, sorotipos e lisotipos - A caracterização das amostras em biotipos, sorotipos e lisotipos foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, SP (Profª Drª Deise P. Falcão).

Pesquisa do potencial patogênico das amostras de *Yersinia* sp. isoladas - a. Pesquisa de toxina termoestável - Foi realizada conforme metodologia descrita por Dean & col. (8), observando modificação proposta por Nunes & Ricciardi (30).

b. Teste de auto-aglutinação (3) - A partir de uma colônia de *Yersinia* cultivada por 48 horas a 25°C em ágar desoxicolato citrato (BBL) foram semeados dois tubos contendo meio de Clark & Lubs, sendo um incubado a 25°C e o outro a 37°C, por 20 horas. Para cada amostra foram escolhidas três colônias para o teste. O resultado foi considerado positivo quando a aglutinação foi verificada apenas no tubo incubado a temperatura de 37°C, mostrando um crescimento homogêneo no tubo incubado a 25°C. O teste foi considerado negativo quando, sob ambas as temperaturas, ocorreu crescimento homogêneo.

c. Teste de cálcio dependência (4) - As amostras de *Yersinia* sp. foram semeadas em caldo infuso de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 25°C, por 24 horas. Decorrido esse período, os crescimentos foram diluídos em salina tamponada pH 7.4. A partir das diluições 10^{-5} e 10^{-6} , foram semeados 0,1ml em placas de BHI adicionado de 2% de ágar, e incubadas a 25°C e 37°C. O teste foi considerado positivo quando houve

crescimento homogêneo na placa incubada a 25°C e o aparecimento de colônias grandes e pequenas na incubada a 37°C. Foi considerado negativo quando sob ambas as temperaturas, ocorreu crescimento homogêneo. A amostra que forneceu teste positivo foi semeada em BHI, adicionado de 2% de ágar e 30mM de CaCl₂ (9), para confirmar a dependência do cálcio associado com a temperatura. A confirmação desta dependência foi mostrada pelo aparecimento de crescimento homogêneo em ambas as temperaturas.

Resultados

Análise físico-química e microbiológica das águas examinadas - As temperaturas médias das águas dos estuários foram semelhantes e em torno de 28,0°C. Nas águas dos córregos, rios, mar e lagoa, verificaram-se médias de 20,0°C; 22,0°C; 22,0°C e 24,0°C, respectivamente.

O pH das águas apresentou-se alcalino nos estuários, no mar e na lagoa com médias que variaram de 7,4 a 8,0. As amostras de água doce forneceram valores mais baixos do que as salgadas, com leve tendência à acidez (6,0 a 6,9). As médias aritméticas obtidas nas determinações da salinidade das águas salgadas mostraram valores de 17,8 e 24,3% para os dois estuários, 32,6% para as águas do mar e, finalmente, 14,8% para as águas da lagoa.

Os índices colimétricos encontrados para as águas dos estuários, rios e lagoa (contagens em torno de 10⁵ bactérias/100ml para coliformes totais e fecais) permitiram caracterizá-las como águas de elevada contaminação fecal (12, 32). As águas dos córregos e do mar foram bem menos poluídas que as demais, registrando-se índices próximos a 10² bactérias/100ml para coliformes totais e fecais.

Isolamento de *Yersinia* sp. de redutos aquáticos - A técnica de isolamento anteriormente relatada levou à obtenção de um bom percentual de isolamento (42,2%) de *Yersinia* sp. a partir da análise das sessenta e quatro amostras de água processadas (Tabela 1). A adoção desta metodologia permitiu a caracterização de 55 amostras de *Yersinia* sp. dos oito locais de coleta estudados. A maior frequência de isolamento foi a de *Y. intermedia* com 34 amostras (61,8%) seguidos de 10 amostras de *Y. enterocolitica* (18,2%), nove de *Y. frederiksenii* (16,3%) e de duas amostras de *Y. kristensenii* (3,6%).

Tabela 1 - Índice de positividade verificado entre as amostras de água doce, salgada, estuário e lagoa, examinadas com relação à presença de *Yersinia* sp.

Símbolos: * Local 3 = Situado próximo a ponte que dá acesso à Ilha do Fundão; ** Local 6 = Situado em frente à Ilha do Governador, distando do Local 3 aproximadamente 1,2Km

Tipos de água	Origem	Locais de Coleta	Relação do nº de amostras de água examinadas/ nº de amostras positivas para <i>Yersinia</i> sp. (%)	
doce	córregos (Parque Nacional da Tijuca)	Paulo e Virgínia Retiro dos Pintores	8/2 8/2	(25%) (25%)
doce	rios (Rio Cachoeira)	Boa Vista Furnas	8/8 8/4	(100%) (50%)
salgada	mar	Barra da Tijuca	8/1	(12,5%)
salgada	estuários (Ilha do Fundão)	Local 3* Local 6**	3/4 8/2	(50%) (25%)
salgada	lagoa	Ilha dos Pescadores	8/3	(37,5%)
Total			64/26	(42,2%)

Classificação das amostras de *Yersinia* sp. em biotipos, sorotipos e lisotipos - Das dez amostras de *Y. enterocolitica*, três foram identificadas no biotipo 1 e uma biotipo 2. As demais não se enquadram em nenhuma das cinco biotipos proposto por Wauters (42), comportando-se de modo diversificado em algumas provas bioquímicas. Quanto aos sorotipos, pode-se constatar que, das cinquenta e cinco amostras de *Yersinia* sp. isoladas, trinta e oito (69%) foram classificadas em quinze diferentes sorotipos, sendo as restantes dezessete (31%), não aglutináveis frente aos 34 antissoros conhecidos. Os sorotipos mais frequentemente encontrados foram o 0:16 (12,7%), 0:14 (10,9%), 0:10 [K₁] (9,1%), 0:4,33 (7,27%), O:[K₁] (7,27%) e 0:5 (5,45%).

Apenas dois lisotipos foram encontrados: Xo e Xz, havendo predominância do primeiro independentemente das amostras terem sido classificadas como *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* (Tabelas 2 e 3).

Comportamento das amostras de *Yersinia* sp. nas provas de patogenicidade estudadas - Dezessete amostras de *Yersinia* sp. (31%) das cinquenta e cinco isoladas, produziram enterotoxina termoestável. Uma reduzida percentagem (3,6%) era autoaglutinável e 29% (16 amostras) foram positivas na prova de cálcio dependência (Tabelas 2 e 3).

Discussão

As análises físico-químicas das coleções aquáticas estudadas, mostraram entre si variações pouco significativas, não constituindo provavelmente fatores limitantes no isolamento de *Yersinia* sp. tendo em vista a capacidade desses microrganismos de crescer tanto a temperatura de refrigeração (11, 19) quanto a 39°C (28), em uma

Tabela 2 - Características das 38 amostras de *Yersinia* sp. isoladas de águas doce na cidade do Rio de Janeiro.

Símbolos: NAG = Amostras não aglutinável; a = Amostra Voges Proskauer e rammose negativas; b = Amostra Voges Proskauer negativa e citrato positiva; c = Amostra Voges Proskauer negativa e melobiase, metil D glicosidase e rafinose positivas; d = Amostras melobiase, metil D glicosidase e rafinose positivas

Locais de coleta	Amostras classificadas em biotipos, sorotipos e lisotipos	Nº de amostras encontradas	Nº de amostras testadas		Nº de amostras positivas
			Toxina ST 2h	Auto aglutinação 4h	
Córregos	<i>Y. frederiksenii</i> -0:16-Xo	1	1/1	1/1	1/0
	<i>Y. frederiksenii</i> ^a -0:10[K ₁]-Xz	1	1/1	1/1	1/1
	<i>Y. enterocolitica</i> ^b -0:10[K ₁]-Xz	1	1/1	1/1	1/0
	<i>Y. frederiksenii</i> -0:16-Xz	1	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. frederiksenii</i> ^c -0:10[K ₁]-Xo	2	2/2	2/2	2/1
	<i>Y. enterocolitica</i> 1-0:5-Xz	2	2/1	2/2	2/0
	<i>Y. intermedia</i> - 0:[K ₁]-Xo	4	4/1	4/0	4/3
	<i>Y. intermedia</i> - NAG-Xz	5	5/1	5/0	5/1
	<i>Y. intermedia</i> - NAG-Xo	4	4/0	4/0	4/1
	<i>Y. enterocolitica</i> ^c -0:7,8-Xo	1	1/0	1/0	1/1
Rios	<i>Y. kristensenii</i> -0:11,24-Xo	1	1/1	1/1	1/0
	<i>Y. frederiksenii</i> -NAG-Xz	1	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> -0:15-Xz	1	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> -0:14-Xo	4	4/0	4/1	4/1
	<i>Y. intermedia</i> -0:14-Xz	1	1/0	1/0	1/1
	<i>Y. intermedia</i> -0,25,35-Xo	1	1/0	1/0	1/1
	<i>Y. intermedia</i> -0:4,33-Xz	2	2/1	2/0	2/0
	<i>Y. enterocolitica</i> 1-0:10[K ₁]-Xo	1	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. enterocolitica</i> ^d -NAG-Xo	1	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> -NAG-Xz	1	1/0	1/1	1/0

Tabela 3 - Características das 17 amostras de *Yersinia* sp. isoladas de águas salgadas na cidade do Rio de Janeiro.

Símbolos: NAG = Amostra não aglutinável; a = Amostra Voges Praskauer negativa; b = Amostra melobiose, metil D glicosidase e rafinose positivas

Locais de coleta	Amostras classificadas em biotipos, sorotipos e lisotipos	Nº de amostras encontradas	Nº de amostras testadas			Nº de amostras positivas
			Toxina 2h	ST 4h	Auto aglutinação	
Mar	<i>Y. frederiksenii</i> - 0:16-Xo	1	1/0	1/0	1/0	1/1
Estuários	<i>Y. enterocolitica</i> ^a - 2-0:16-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. enterocolitica</i> ^b - 0:16-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> - 0:10-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/1
	<i>Y. intermedia</i> - 0:4,33-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/1
	<i>Y. intermedia</i> - NAG-Xo	1	1/0	1/0	1/0	1/1
	<i>Y. intermedia</i> - 0:13,7-Xo	1	1/0	1/1	1/0	1/0
	<i>Y. kristensenii</i> - NAG - Xo	1	1/1	1/1	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> - 0:17-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> - NAG - Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/1
Lagoa	<i>Y. enterocolitica</i> ^b - 0:16-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> - 0:18-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. frederiksenii</i> - 0:16-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. frederiksenii</i> - 0:2a, 2b, 3-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0
	<i>Y. intermedia</i> - NAG - Xz	2	2/1	2/0	2/0	2/0
	<i>Y. intermedia</i> - 0:4,32-Xz	1	1/0	1/0	1/0	1/0

abrangente faixa de pH (36) e ainda serem capazes de tolerar elevadas concentrações de NaCl (22). Pela Tabela 1 pode-se observar que embora o menor índice de isolamento (12,5%) tenha sido encontrado em águas marinhas (Barra da Tijuca), outros fatores que não a salinidade, poderiam ter influenciado negativamente no isolamento de *Yersinia* sp. como a presença de micropredadores, bacteriófagos, substâncias tóxicas e competição por nutrientes (18).

Comparando-se as análises colimétricas das águas com os percentuais de isolamento encontrados para a presença de *Yersinia* sp. (Tabela 1), foi possível observar que os maiores índices de positividade foram encontrados nos locais com elevada contaminação fecal, exceção apenas notada em um dos estuários (Local 6), que apesar de significativamente poluído, apresentou a mesma percentagem (25%) de isolamento das águas de córrego, estas com baixos níveis colimétricos. Com efeito, pode-se inferir que a análise colimétrica das águas serve como um provável indicador da presença de *Yersinia* sp. no ambiente aquático.

As cinqüenta e cinco amostras de *Yersinia* sp. foram fenotipicamente identificadas em 4 espécies: *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii* (Tabelas 1 e 2). Comparando-se a frequência de isolamento das quatro espécies do gênero *Yersinia* encontradas neste trabalho, com aquelas obtidas em águas superficiais por Shayegani & col. (33) nos Estados Unidos e em águas de rio por Fukushima & col. (17) no Japão, observa-se que também a espécie *Y. intermedia* foi a mais frequentemente isolada, seguindo-se *Y. enterocolitica*, *Y. frederiksenii* e *Y. kristensenii*. Estes dados, por sua semelhança com os encontrados neste trabalho, demonstram que os "habitats" destas espécies são comuns, independentemente de localizações geográficas tão diversas como os Estados Unidos, Japão e Brasil.

Dessas espécies, apenas *Y. enterocolitica* havia sido implicada como suspeita de casos de gastroenterite humana tendo como fonte de contágio águas poluidas com esse microrganismo (10, 21, 24). As demais espécies encontradas são usualmente isoladas do meio ambiente (26) e, raramente associadas a infecções humanas, podendo muitas vezes comportarem-se como patógenos oportunistas ou então serem encontrados em indivíduos ou animais saudáveis (5, 6, 26, 40).

A semelhança de trabalhos anteriores (17, 33) foi notado um elevado percentual (31%) de amostras de *Yersinia* sp. não sorotipáveis. Os sorotipos mais frequentemente encontrados foram o 0:16; 0:14; 0:10 [K1]; 0:4,33; 0:[K1] e 0:5, não

tendo sido isolados outros relacionados à casos de infecção em humanos na Europa e Brasil (0:3), nos Estados Unidos (0:8) e no Canadá (0:5), reafirmando informações de que estes sorotipos, ou estão ausentes ou são encontrados em baixa frequência na água (23). Aparentemente, é de grande significado epidemiológico o isolamento de amostras de *Y. enterocolitica* pertencentes ao sorotipo 0:5, pelo fato do mesmo estar implicado em infecções humanas no Estado do Rio de Janeiro (13, 14, 35), além de já ter sido encontrado na mesma cidade, em leite cru e/ou pasteurizado (37, 41), em humanos e animais diarréicos ou não (29) e em um paciente com manifestações reumáticas (2). A presença deste sorotipo pode representar um risco em potencial à saúde pública, pela possibilidade de sua transmissão através do ambiente aquático para animais e humanos.

No presente estudo, a maioria das amostras de *Yersinia* sp. mostraram-se avirulentas frente às três provas de patogenicidade investigadas. De um modo geral, as características de virulência avaliadas não se mostraram relevantes na pesquisa da patogenicidade das amostras de *Yersinia* sp. de origem ambiental, vindo deste modo corroborar proposições de Happerud & Lassen (20) e Nunes (29) de que esses testes de virulência sejam mais expressivos entre amostras de *Yersinia* sp. implicadas em casos clínicos do que nas espécies isoladas do ambiente.

A capacidade de ambientes aquáticos abrigar amostras de *Yersinia* sp. e estes atuarem como reservatórios naturais, parece bastante clara. Resta, contudo, uma indagação a respeito da sobrevida das diferentes espécies nesses ambientes, o que é assunto de investigação atualmente no laboratório dos autores.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association (APHA) - Standard methods for the examination of water and wastewater. 15.ed. Washington D.C., APHA, 1980.
2. Asensi, M.D. & Hofer, E. - Pesquisa de *Yersinia enterocolitica* em pacientes reumáticos. I - Bacteriologia. Rev. Microbiol. (São Paulo), 16:260-268, 1985.
3. Aulizio, C.G.C.; Stanfield, J.T.; Weagant, S.D. & Hill, W.E. - Yersiniosis associated with tofu consumption: serological biochemical and pathogenicity studies of *Yersinia enterocolitica* isolates. J. Food Protection, 46:226-230, 1983.
4. Berche, P.A. & Carter, P.B. - Calcium requirement and virulence of *Yersinia enterocolitica*. J. Med. Microbiol., 15:277-284, 1982.
5. Bercovier, H.; Ursing, J.; Brenner, D.J.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R.; Carter, G.P. & Mollaret, H.H. - *Yersinia kristensenii*: a new species of Enterobacteriaceae composed of sucrose - negative strains (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol., 4:219-224, 1980.
6. Brenner, D.J.; Bercovier, H.; Ursing, J.; Alonso, J.M.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R., Carter, G.P. & Mollaret, H.H. - *Yersinia intermedia*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose-positive, melibiose-positive, raffinose-positive strains (formerly called *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol., 4:207-212, 1980.
7. Carlucci, A.F. & Pramer, D. - Factor affecting survival of bacteria in seawater. Appl. Microbiol., 7:388-392, 1959.
8. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1972.
9. Diaz, R.; Salazar, C. & Toyos, J. - *Yersinia enterocolitica* serotype 0:3: study of the correlation between calcium dependency, auto-agglutination and lethal effect. Rev. Diag. Biol., 31:203-208, 1982.
10. Eden, K.V.; Rosenberg, M.L.; Stoopler, M.; Wood, B.; Highsmith, A.K.; Skally, P.; Wells, J. & Feeley, J.C. - Waterborne gastroenteritis at a ski resort associated with the isolation of *Yersinia enterocolitica*. Public Health Report, 2:245-250, 1977.
11. Eiss, J. - Selective culturing of *Yersinia enterocolitica* at a low temperature. Scand. J. Infect. Dis., 7:249-251, 1975.

12. Environment Protection Agency - Quality criteria for water. Washington, D.C., 1976.
13. Ferreira, M.C.S.; Otto, S.S.; Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Isolamento de *Campylobacter* e *Yersinia enterocolitica* associados a diarréias infantis no Rio de Janeiro. Resumos do X Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, p.62, 1979.
14. Fontes, C.F.; Ferreira, M.C.S.; Nunes, M.P.; Otto, S.S.; Couto, M.M.; Martins, M.R. & Ricciardi, I.D. - Pesquisa de agentes bacterianos associados a diarréia infantil no Rio de Janeiro. Resumos do X Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, p.61, 1979.
15. Freitas, A.C.; Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Comparação entre as técnicas de filtração e centrifugação no isolamento de *Yersinia enterocolitica* a partir da água do mar. Resumos do XII Congresso Brasileiro de Microbiologia, São Paulo, SP, p.164, 1983.
16. Fukushima, H.; Nakamura, R.; Hitsuka, S.; Tsubokura, M.; Otsuki, K. & Kawaoka, Y. - Prospective systematic study of *Yersinia* spp. in dogs. J. Clin. Microbiol., 19:616-622, 1984.
17. Fukushima, H.; Saito, K.; Tsubokura, N. & Otsuki, K. - *Yersinia* spp. in surface water in Matsue, Japan. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 179:235-247, 1984.
18. Greenberg, A.E. - Survival of enteric organism in sea water. Public Health Repts. (U.S.), 71:77-86, 1956.
19. Greenwood, J.R.; Flanigan, S.M.; Pickett, M.J. & Martin, W.J. - Clinical isolation of *Yersinia enterocolitica*: cold temperature enrichment. J. Clin. Microbiol., 2:559-560, 1975.
20. Kapperud, G. & Lassen, J. - Relationship of virulence - associated autoagglutination to hemagglutinin production in *Y. enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacteria. Infec. Immunity, 42:163-169, 1983.
21. Keet, E.E. - *Yersinia enterocolitica* septicemia. N.Y. State J. Med., 74:2226-2230, 1974.
22. Krieg, N.R. & Holt, J.G., eds. - Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, v.1, 1984.
23. Langeland, G. - *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like bacterian in drinking water and sewage sludge. Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. B, 91:179-185, 1983.
24. Lassen, J. - *Yersinia enterocolitica* in drinking water. Scand. J. Infect. Dis., 4:125-127, 1972.
25. Martinez, M.B. & Moura, R.A.A. - *Yersinia enterocolitica* em fezes de crianças com diarréia aguda. Rev. Microbiol. (São Paulo), 15:33-34, 1984.
26. Mollaret, H.H. - Curso "Yersinia". In: - Congresso Latino Americano de Microbiologia, 9, São Paulo, 1983 e Congresso Brasileiro de Microbiologia, 12, São Paulo, 1983.
27. Mollaret, H.H.; Bercovier, H. & Alonso, Jr., J.M. - Summary of the data received at the WHO Reference Center for *Yersinia enterocolitica*. Contr. Microbiol. Immunol., 5:174-184, 1979.
28. Niléhn, B. - Studies on *Yersinia enterocolitica* with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute enteric disease. Acta pathol. Microbiol. Scand. (Suppl. 206):1-48, 1969.
29. Nunes, M.P. - Ocorrência de *Yersinia* sp. na cidade do Rio de Janeiro. Instituto de Microbiologia, 1985. (Tese de Doutorado).
30. Nunes, M.P. & Ricciardi, I.D. - Detection of *Yersinia* heat-stable enterotoxin by suckling mouse bioassay. J. Clin. Microbiol., 13:783-786, 1981.
31. Peixotto, S.S.; Finne, G.; Hanna, M.O. & Vanderzant, C. - Presence, growth and survival of *Yersinia enterocolitica* in oysters, shrimp and crab. J. Food Prot., 42:974-981, 1979.
32. Secretaria Especial do Meio Ambiente (SEMA) - Legislação básica. Brasília, Brasil, Ministério do Interior, p.30, 1977.
33. Shayegani, M.; De Forge, I.; Mc Glynn, D.M. & Root, T. - Characteristic of *Yersinia enterocolitica* and related species isolate from human, animal and environmental sources. J. Clin. Microbiol., 14:304-312, 1981.

34. Strickland, J.P.H. & Parson, T.R. - A practical handbook of sea water analysis. 2.ed. Fisheries Res. Board of Canada, 1972.
35. Stumph, M.; Ricciardi, I.D.; Oliveira, N.; Sabrá, A. & Bernhoeft, M. - *Yersinia enterocolitica* as a cause of infantile diarrhoea in Rio de Janeiro, Brazil. Rev. Bras. de Pesquisa Med. e Biol., 11:383-384, 1978.
36. Swaminathan, B.; Harmon, M.C. & Mehlman, I.J. - A review *Yersinia enterocolitica*. J. Appl. Bacteriol., 52:151-183, 1982.
37. Tibana, A. - Estudo bacteriológico do leite comercializado no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, 1981. (Tese de Doutorado).
38. Toledo, M.R.F. de; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - EPM - Modificação do meio de Rugai e Araújo para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir da glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol. (são Paulo), 13:309-315, 1982.
39. Toledo, M.R.F. de; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - Mili - Um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. Rev. Microbiol. (São Paulo), 13:230-235, 1982.
40. Ursing, J.; Brenner, D.J.; Bercovier, H.; Fanning, G.R.; Steigerwalt, A.G.; Brault, J. & Mollaret, H.H. - *Yersinia frederiksenii*: a new species of Enterobacteriaceae composed of rhamnose - positive strain (formerly called atypical *Yersinia enterocolitica* or *Yersinia enterocolitica*-like). Curr. Microbiol., 4:213-218, 1980.
41. Warmken, M.B. - Ocorrência de *Yersinia* sp. em leite e carnes comercializados no Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, 1985. (Tese de Mestrado).
42. Wauters, G. - Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. Université Catholique de Louvain, 1970.
43. Weagant, S.D. & Kaysner, C.A. - Modified enrichment broth for isolation of *Yersinia enterocolitica* from nonfood sources. Appl. Environ. Microbiol., 45:468-471, 1983.

CAMPYLOBACTER TERMOFÍLICO EM FEZES DE CRIANÇAS COM DIARRÉIA: ESTUDO COM CONTROLES*

Maria de Fátima Borges Pavan

Elsa Masaé Mamizuka

& Marina Baquerizo Martinez

Disciplina de Microbiologia Clínica
Deptº de Análises Clínicas e Toxicológicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 580/Bloco 17
Caixa Postal 30786
05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foram determinadas as frequências de isolamento de *Campylobacter* termofílico e de outros enteropatógenos das fezes de 208 crianças com diarréia aguda (Grupo diarréico) e de 133 crianças sem sintomas gastrintestinais (Grupo controle). *Campylobacter* sp. foi recuperado das fezes de 29 crianças do grupo diarréico, tendo sido o agente bacteriano isolado com maior frequência nesse grupo de crianças - 13,9%, seguido por EPEC - 6,8%, *Shigella* sp. - 4,3% e *Salmonella* sp. - 2,9%. Não foi isolada nenhuma cepa de *Campylobacter* termofílico das fezes das crianças do grupo controle. Baseados nestes dados salientamos a necessidade da pesquisa de *Campylobacter* termofílico de forma rotineira em crianças com diarréia aguda, a fim de melhorar o diagnóstico etiológico dessa afecção.

Summary

Thermophilic Campylobacter in stools of children with diarrhea: study with controls

The frequency of thermophilic *Campylobacter* and other enteropathogens isolation from 208 children stools with acute diarrhea (Diarrheal group) and 133 children without gastrintestinal symptoms (Control group) was determined. *Campylobacter* sp. was recovered from 29 children stools of the Diarrheal group, being the bacterial agent isolated with higher frequency in this group of children - 13,9%, followed by EPEC - 6,8%, *Shigella* sp. - 4,3% and *Salmonella* sp. - 2,9%. Thermophilic *Campylobacter* was not isolated from stools of any child of the Control group. Based on these data we emphasize the necessity of investigating the presence of thermophilic *Campylobacter* in the stools of children with acute diarrhea, as a routine procedure, so that we can improve the etiological diagnostic of such disease.

Introdução

O gênero *Campylobacter* é formado por bacilos Gram-negativos, curvos a espiralados. Seus representantes incluem patógenos de animais e homens, assim como

*Parte da Tese de Mestrado da primeira autora.

saprófitas (20, 21).

Infecção com *Campylobacter* sp. é conhecida pelos médicos veterinários há muitos anos, como causa comum de doença entre os animais domésticos. Apenas recentemente, porém, espécies de *Campylobacter* têm sido associadas a muitas patologias humanas, tais como: bacteremia, artrite séptica, aborto, endocardite, meningite, meningoencefalite, tromboflebite e síndrome de Reiter, principalmente em indivíduos com doenças debilitantes ou imunodeprimidos (21). A principal entidade clínica atribuída a esses microrganismos, no entanto, é a gastroenterite, sendo causada por suas espécies termofílicas (*C. jejuni/C. coli*) e acometendo indivíduos de todas as idades (20). Como acontece com outros patógenos intestinais, a infecção causada por *Campylobacter* nem sempre produz sintomas, encontrando-se na literatura relatos de excretores assintomáticos, principalmente entre os familiares de pacientes infectados (3).

Na América Latina o primeiro relato de *Campylobacter* termofílico associado com diarréia foi feito por Ricciardi & col. (15), em 1979, no Rio de Janeiro, Brasil. Os autores, estudando 186 crianças com idade máxima de 5 anos, as quais apresentavam diarréia aguda ou crônica, isolaram 9 cepas de *Campylobacter*, correspondendo a uma incidência de 4,8%. Posteriormente, no Brasil, foram relatados novos isolamentos dessa bactéria de fezes de crianças diarréicas, com frequências variando entre 6,4 a 9,3% (6, 10, 12).

Considerando a importância que se tem dado às espécies termofílicas de *Campylobacter* como agentes etiológicos de diarréia, e tendo em vista os poucos estudos em nosso meio sobre esses microrganismos, propusemo-nos a determinar sua frequência de isolamento, tanto de crianças com diarréia aguda como daquelas sem sintomas gastrintestinais, correlacionando os dados obtidos com a idade e o sexo das mesmas. Foram ainda comparadas as frequências de isolamento de *Campylobacter* termofílico e de outros enteropatógenos.

Material e Métodos

Durante o período compreendido entre março e agosto de 1982, foram estudadas, na cidade de São Paulo, SP, amostras de fezes de 341 crianças de ambos os sexos, de nível sócio-econômico baixo, com idades compreendidas entre 11 dias e 12 anos, divididas em 2 grupos:

- *Grupo diarréico* (crianças com sintomatologia) - 208 crianças com idades compreendidas entre 11 dias e 12 anos, com diarréia aguda, atendidas no Serviço de Pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo. Essas amostras foram processadas imediatamente após sua coleta, sem uso de meio de transporte. Nelas foram pesquisados ainda: *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Escherichia coli* enteroinvasora, *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (crianças com até 3 anos de idade), helmintos, protozoários e rotavírus.

- *Grupo controle* (crianças sem sintomatologia) - 133 crianças eutróficas, com idades compreendidas entre 5 meses e 12 anos, sem sintomas gastrintestinais. De cada criança desse grupo obteve-se uma amostra de fezes, a qual foi dividida em 2 frascos plásticos, um com meio de transporte de Cary-Blair mod., para pesquisa das enterobactérias patogênicas acima citadas e de *Campylobacter* e o outro, sem nenhum meio de cultura, para a pesquisa de helmintos e protozoários. Nestas amostras não foi realizada pesquisa de rotavírus. Todas as amostras foram processadas dentro de um período não superior a 8 horas após a colheita do material.

Para pesquisa de *Campylobacter* termofílico as amostras de fezes foram semeadas em placas contendo o meio citado por Sack & col. (16), que constitui uma modificação do meio de Skirrow, tendo-se utilizado na sua preparação a mistura de antibióticos Campilofar (Cefar Fármaco-Diagnóstica Ltda., São Paulo SP, Brasil). As placas semeadas foram incubadas em uma jarra com vela, a 42°C e examinadas após 24 e 48 horas.

As cepas de *Campylobacter* sp. isoladas foram identificadas presuntivamente através de coloração de Gram e das provas de catalase e oxidase. Para a identificação definitiva foram utilizadas as seguintes provas (19): crescimento a

25 e 42°C, sensibilidade ao ácido nalidíxico, hidrólise do hipurato e produção de H₂S em meio com ferro.

As enterobactérias patogênicas foram pesquisadas utilizando-se os métodos descritos por Edwards & Ewing (5).

Para o exame parasitológico das amostras de fezes empregou-se o método de sedimentação.

A detecção de rotavírus nas amostras do grupo diarréico foi realizada por meio de reação imunoenzimática em fase sólida, com a utilização de reagentes comerciais "Rotazyme-rotavirus Diagnostic kit" (Abbott Laboratories, Chicago, EUA).

Resultados

Não foi isolada nenhuma cepa de *Campylobacter* termofílico das 133 amostras de fezes das crianças do grupo controle.

Espécies temofílicas de *Campylobacter* (*C. jejuni/C. coli*) foram isoladas das fezes de 29 crianças do grupo diarréico (13,9%), não tendo sido notada diferença estatisticamente significativa na frequência de isolamento quanto ao sexo ($X^2 = 1,55$) e quanto à idade ($X^2 = 1,635$) dessas crianças (Tabela 1).

Das cepas de *Campylobacter* isoladas, 25 (86,2%) foram classificadas como *Campylobacter jejuni* biotipo 1 e 4 (13,8%) como *Campylobacter coli*, segundo esquema de identificação de Skirrow & Benjamin (19).

Campylobacter termofílico foi isolado como único agente enteropatogênico de 15 (51,7%) das 29 amostras positivas para essa bactéria; em quase a totalidade das 14 amostras restantes encontrava-se associado com rotavírus, em presença ou não de outros agentes. Na única amostra onde não foi detectado rotavírus, o *Campylobacter* estava associado a *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* (Tabela 2).

Associação de rotavírus com outras bactérias enteropatogênicas nas amostras negativas para *Campylobacter* foram observadas em 11 casos.

Dentre os agentes enteropatogênicos encontrados no grupo diarréico, *Campylobacter* foi o segundo mais frequente, tendo sido sua ocorrência inferior apenas à de rotavírus (56,2%). As demais bactérias enteropatogênicas pesquisadas foram isoladas com as seguintes frequências: *Salmonella* sp. - 2,9%; *Shigella* sp. - 4,3%; *Escherichia coli* enteropatogênica clássica - 6,8% e *Escherichia coli* enteroinvasora - 0,5% (Tabela 3).

Discussão

A frequência de isolamento de *Campylobacter* termofílico de crianças com diarréia aguda encontrada neste trabalho (13,9%) foi semelhante às encontradas por alguns autores (7, 8, 9, 13) em países do 3º mundo, tais como: Nigéria, Bangladesh, República da África Central e Chile, onde o isolamento de *Campylobacter* tem atingido porcentagens de 12 a 14%. Existe, no entanto, uma grande variação nos resultados obtidos por diferentes autores (1, 2, 4, 10, 11, 14, 15, 18, 22), tanto

Tabela 1 - Positividade para *Campylobacter* termofílico nas 208 crianças com diarréia aguda, segundo o sexo e a faixa etária.
Símbolos: ♂ = Crianças do sexo masculino;
♀ = crianças do sexo feminino; * = Em meses (m) e anos (a); ** i.c. = Intervalo de confiança

Faixa etária*	Estudadas	Número de amostras		
		♂	♀	Positivas
0 → 6m	63 [40 23]	12 [6 6]	19,0 ± 9,4 ou dp = 4,9	
6m → 1a	44 [23 21]	5 [3 2]	11,4 ± 9,1 ou dp = 4,8	
1a → 2a	54 [31 23]	7 [2 5]	13,0 ± 8,7 ou dp = 4,6	
2a → 6a	39 [21 18]	5 [2 3]	12,8 ± 10,2 ou dp = 5,3	
6a → 12a	8 [4 4]	-	-	-
Total	208 [119 89]	29 [13 16]	13,9 ± 8,1 ou dp = 4,3	

Tabela 2 - Microrganismos patogênicos encontrados nas 29 amostras de fezes positivas para *Campylobacter* sp.

Nº de casos		1 (3,4)	1 (3,4)	1 (3,4)	1 (3,4)	1 (3,4)	2 (6,9)	7 (24,1)	15 (51,7)
	Microrganismos								
Campylobacter sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rotavírus		+	+	+	+	+	+	+	
Shigella sp.									
E. coli (EPEC)									+
S. mansoni									
A. lumbricooides	+			+					
G. lamblia				+					
T. trichiura	+			+					

em países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, registrando-se na literatura taxas de isolamento variando de 3,0 a 11,0% entre os primeiros e de 4,8 a 35,0% entre os demais. No Brasil, encontram-se relatos de frequências de isolamento variando desde 4,8 até 9,3% (6, 10, 12, 15).

O grupo de pacientes por nós estudado pertence às classes sócio-econômico baixas, o que justificaria a alta frequência de isolamento de *Campylobacter* dessas crianças. Isto pode ser explicado pelos altos níveis de contaminação ambiental aos quais as mesmas estão expostas, por pertencerem a uma população que vive em aglomerados, onde, além da ausência de saneamento básico, permanecem em estreita convivência com animais que normalmente abrigam *Campylobacter* nas fezes (1).

Campylobacter não foi isolado das fezes de nenhuma criança do grupo controle, à semelhança do que ocorreu nos trabalhos de vários autores (1, 2, 11, 14, 18). O fato de *Campylobacter* ter sido isolado de crianças com diarréia e não de crianças sadias, vem reforçar a idéia de ser esse microrganismo o agente etiológico daquela afecção.

Analisamos a frequência de isolamento de *Campylobacter* das crianças, de acordo com a faixa etária, dividindo-as em 5 subgrupos: crianças de 0-6 meses, de 6 meses-1 ano, de 1-2 anos, de 2-6 anos e de 6-12 anos de idade. Aparentemente, o grupo etário de 0 a 6 meses apresentou maior taxa de isolamento de *Campylobacter* (19%), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os diferentes grupos etários considerados, à semelhança do que ocorreu com Shucheng & col. (17) na China. Em contrapartida, alguns autores (15, 23) relatam maior frequência de isolamento de *Campylobacter* em crianças menores de um ano de idade.

Tabela 3 - Distribuição da frequência de agentes bacterianos, virais e parasitários em fezes de crianças com e sem sintomas gastrintestinais.

Símbolos: * = Outros: no grupo diarréico - 1 S. mansoni; no grupo controle - 2 Entamoeba histolytica, 2 Strongyloides stercoralis, 1 Chilomastix mesnili e 1 Iodamoeba butschili; (1) = 208 amostras analisadas no grupo diarréico e 133 no grupo controle; (2) = 192 amostras analisadas no grupo diarréico e 77 no grupo controle; (3) = 208 amostras analisadas no grupo diarréico e não pesquisado no grupo controle; (4) = 156 amostras analisadas no grupo diarréico e 133 no grupo controle

Agentes encontrados	Grupo diarréico		Grupo controle	
	Nº	%	Nº	%
Bactérias enteropatogênicas				
<i>Campylobacter</i> sp. (1)	29	13,9	-	-
<i>Salmonella</i> sp.	6	2,9	1	0,7
<i>Shigella</i> sp. (1)	9	4,3	3	2,2
EIEC (1)	1	0,5	-	-
EPEC (2)	13	6,8	9	11,7
Vírus				
Rotavírus (3)	117	56,2	não pesquisado	
*Parasitas (4)				
<i>Endolimax nana</i>	6	3,8	16	12,0
<i>Entamoeba coli</i>	5	3,2	15	11,3
<i>Giardia lamblia</i>	8	5,1	15	11,3
<i>Ascaris lumbricooides</i>	18	11,5	6	4,5
<i>Hymenolepis nana</i>	2	1,3	2	1,5
<i>Trichuris trichiura</i>	22	14,1	7	5,3

É interessante notar, porém, que em vários trabalhos (15, 22, 23) não se leva em conta o percentual de casos positivos em relação ao número total de amostras estudado em cada faixa etária, considerando-se apenas o número absoluto de casos positivos. Isso parece-nos tendencioso, uma vez que uma superamostragem em determinadas faixas etárias em relação a outras poderia causar distorções nos resultados. O mesmo ocorre quando se estuda a predominância da infecção por *Campylobacter* de acordo com o sexo do paciente.

O isolamento de *Campylobacter*, como único agente enteropatogênico, ocorreu na maioria de nossas amostras positivas para essa bactéria (51,7%), como pode-se observar na Tabela 2. Se não for considerada a pesquisa de rotavírus, a taxa de isolamento de *Campylobacter* como agente único subirá para 75,9% e sem considerar também a pesquisa de helmintos e protozoários essa taxa será de 89,7%, porcentagem essa que está dentro da faixa encontrada por vários autores que não pesquisaram rotavírus e/ou parasitas, que abrange desde 82,3 até 96,8% de amostras positivas para *Campylobacter* sem outro enteropatogênico (2, 4, 18, 22).

Em relação aos demais enteropatogênicos, o isolamento de *Campylobacter* das crianças com diarréia foi quase tão frequente quanto o total combinado de todos os agentes bacterianos pesquisados (Tabela 3). Tais achados estão de acordo com os de outros autores (4, 18, 22) que consideram *Campylobacter* como um dos principais agentes causadores de enterite.

Com base nos dados obtidos, salientamos a necessidade de se examinar as fezes de todos os pacientes com diarréia aguda especificamente para a presença de *Campylobacter*, além da pesquisa de outros patógenos entéricos, a fim de se melhorar o diagnóstico etiológico dessa afecção.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Luiz R. Trabulsi, Chefe do Departamento de Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina e ao Dr. Heriberto Hernandez Jaramillo, pela colaboração prestada na implantação do método para isolamento e identificação de *Campylobacter* termofílico em nosso meio, o que tornou possível a realização do presente trabalho, e à Profa. Dra. Sumie H. Shimizu, pela colaboração prestada na análise estatística.

Referências Bibliográficas

1. Blaser, M.J.; La Force, M.; Wilson, N.A. & Wang, W.L.L. - Reservoirs for human campylobacteriosis. *J. Infect. Dis.* (Chicago), 141:665-669, 1980.
2. Brunton, W.A.T. & Heggie, D. - *Campylobacter*-associated diarrhoea in Edinburgh. *Br. Med. J.* (London), 2:956, 1977.
3. Butzler, J.P. & Skirrow, M.B. - *Campylobacter* enteritis. *Clin. Gastroenterol.* (London), 8:737-765, 1979.
4. Drake, A.A.; Gilchrist, M.J.R.; Washington III, J.A.; Huizenga, K.A. & Van Scott, R.E. - Diarrhea due to *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*: a clinical review of 63 cases. *Mayo Clin. Proc. (Rochester)*, 56:414-423, 1981.
5. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
6. Fernández, H.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Occurrence of *Campylobacter jejuni* in diarrhoeic and non-diarrhoeic children in São Paulo, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 26:150-153, 1984.
7. Garcia Moreno, J. - First isolation in Chile of *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* and *Yersinia enterocolitica* from the stools of young children 2 years of age suffering from acute diarrhea. *Bol. Inst. Salud Pública Chile (Santiago)*, 22:23-26, 1981.
8. Georges, M.C.; Wachsmuth, I.K.; Meunier, D.M.V.; Nebout, N.; Didier, F.; Siopathis, M.R. & Georges, A.J. - Parasitic, bacterial and viral enteric pathogens associated with diarrhea in the Central African Republic. *J. Clin. Microbiol. (Washington)*, 19:571-575, 1984.

9. Glass, R.I. - Epidemiologic and clinical features of endemic *Campylobacter jejuni* infection in Bangladesh. *J. Infect. Dis.* (Chicago), 148:292-296, 1983.
10. Gonzales, Z.; Fagundez Neto, U.; Fernández, J.H.; Wehba, J. & Trabulsi, L.R. - Isolamento de *Campylobacter fetus* ssp. *jejuni* em crianças normais e com diarréia. *J. Pediatr.* (Rio de Janeiro), 57:127-129, 1984.
11. Kirubakaran, C.; Davidson, G.P.; Darby, H.; Hansman, D.; McKay, G.; Moore, B. & Lee, P. - *Campylobacter* as a cause of acute enteritis in children in South Australia. I - A 12-month with controls. *Med. J. Aust.* (Glebe), 68:333-335, 1981.
12. Loureiro, E.C. & Lins, Z.C. - Observações sobre o isolamento de *Campylobacter jejuni* de crianças com gastroenterite aguda em Belém do Pará. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 25:50-52, 1983.
13. Olusanya, A.; Adebayo, J.O. & Williams, B. - *Campylobacter jejuni* as a bacterial cause of diarrhea in Ile-Ife, Nigeria. *J. Hyg. (Cambridge)*, 91:77-80, 1983.
14. Paladini, A. - Research on *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from human feces in the area of Pisa, Italy. *Ann. Sclavo (Siena)*, 24:49-55, 1982.
15. Ricciardi, I.D.; Ferreira, M.C.S.; Otto, S.S.; Oliveira, N.; Sabra, A. & Fontes, C.F. - Thermophilic *Campylobacter*-associated diarrhoea in Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.* (São Paulo), 12:189-191, 1979.
16. Sack, R.B.; Tilton, R.C. & Weissfeld, A.S. - Laboratory diagnosis of bacterial diarrhea. Washington, American Society for Microbiology, p.1-16 (Cumitech, 12), 1980.
17. Shucheng, D.; Shunlin, W.; Weiyu, L.; Huilan, S. & Weizhong, G. - *Campylobacter* enteritis in infants and young children in China. *J. Diar. Dis. Res.*, 1:17-19, 1983.
18. Skirrow, M.B. - *Campylobacter* enteritis: a "new" disease. *Br. Med. J.* (London), 2:9-11, 1977.
19. Skirrow, M.B. & Benjamin, J. - Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. *J. Clin. Pathol.* (London), 33:1122, 1980.
20. Smibert, R.M. - *Campylobacter*. In: - Krieg, N.R. & Holt, J.G. - *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, v.1, p.111-118, 1984.
21. Smibert, R.M. - The genus *Campylobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.* (Palo Alto), 32:673-709, 1978.
22. Svedhem, A. & Kaijser, B. - *Campylobacter fetus* subspecies *jejuni*: a common cause of diarrhea in Sweden. *J. Infect. Dis.* (Chicago), 142:353-358, 1980.
23. Wills, A.Z.; Nonino, J.O.; Guitti, J.C.S. & Minetto, J.O. - Infecção intestinal por *Campylobacter*: estudo clínico de 12 casos. *J. Pediatr.* (Rio de Janeiro), 57:427-429, 1984.

INFLUÊNCIA DE MICRONUTRIENTES E DE EXTRATO DE LEVEDURA NO CRESCIMENTO DE *AZOSPIRILLUM BRASILENSE* EM INCUBADOR ROTATIVO

José Manuel Cabral de Sousa Dias

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Maria Cândida Reginato Facciotti
& Willibaldo Schmidell

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

Resumo

Foram realizados ensaios em incubador rotativo, tendo frutose (5g/l) como fonte de carbono, para estudar a cinética de crescimento de *Azospirillum brasiliense* sp. 245 em presença e na ausência de micronutrientes (Mo, Mn, B, Cu, Zn), e em diversas concentrações de extrato e de água de levedura. Determinou-se que para o crescimento sem fixação de nitrogênio, a 34°C, não há necessidade da adição de micronutrientes ao meio de cultura e que concentrações crescentes de extrato de levedura entre 0,0 e 1,0g/l fazem diminuir a fase "lag" e aumentar a velocidade específica de crescimento celular. A adição de água de levedura, por sua vez, fez diminuir a fase "lag" mas não aumentou a velocidade específica de crescimento. As maiores produtividades foram obtidas para meios de cultura contendo: a) 10g de sólidos de água de levedura/l (0,178g cel/l.h); b) 1,0g ext. levedura/l e adição de micronutrientes (0,164g cel/l.h); c) 1,0g extrato de levedura/l sem micronutrientes (0,161g cel/l.h).

Summary

Influence of micronutrients and yeast extract on Azospirillum brasiliense growth in rotary shaker

The growth kinetics of *Azospirillum brasiliense* sp. 245 was studied by cultivation in shaken flasks, at a temperature of 34°C, with fructose (5g/l) as the main carbon source. Several runs were performed, with and without micronutrients in the culture medium, and also with variable concentrations of yeast extract or yeast water. The results obtained showed that the addition of micronutrients was not necessary to the microorganism growth without nitrogen fixation. Otherwise, the presence of yeast extract in concentrations from 0.0 to 1.0g/l, caused a reduction in the lag phase, and also an increase in the maximum specific growth rate. The addition of yeast water also reduced the lag phase, but did not cause any considerable increase in the maximum specific growth rate. The best productivities were obtained with culture media containing: a) 10g of total solids of yeast water per liter (0.178g/l.h); b) 1.0g of yeast extract per liter and micronutrients (0.164g/l.h); c) 1.0g of yeast extract per liter, without micronutrients (0.161g/l.h).

Introdução

É muito recente a descoberta de que se poderia usar microrganismos fixadores de nitrogênio para se inocular gramíneas. Há pouco mais de dez anos, em trabalhos realizados no Brasil, é que foi demonstrada a possibilidade de associação de raízes de gramíneas e microrganismos do gênero *Azospirillum* (originalmente *Spirillum lipoferum*) que se traduzia em efetiva fixação do nitrogênio atmosférico.

Ao longo desse período, muitas observações foram feitas nos aspectos taxonômicos, ecológicos, bioquímicos, nutricionais e de interação com plantas, principalmente milho, trigo, sorgo, cana-de-açúcar e pastagens. Alguns desses aspectos foram revistos recentemente por Dobereiner (8, 9) e por Boddy & Dobereiner (3).

No tocante à produção industrial dos microrganismos, entretanto, não se tem conhecimento de trabalhos efetuados no Brasil, e mesmo no exterior.

Ocorre que para o pleno desenvolvimento da indústria de inóculantes à base de *Azospirillum* faz-se necessário um trabalho de determinação da cinética do processo fermentativo em relação às condições de operação (pH, temperatura, agitação, aeração) e aos nutrientes disponíveis.

Quando da descrição da espécie, Tarrand & col. (18) demonstraram que *A. brasiliense* não utiliza glicose nem sacarose como fonte de carbono, podendo usar, entretanto, frutose, malato, piruvato, fumarato e succinato, oxaloacetato, gluconato, β-hidroxibutirato, glicerol, e que algumas cepas também utilizam: propionato, galactose, arabinose e citrato. A composição de sais neste trabalho de isolamento e classificação incluía: K_2HPO_4 , $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, Na_2MoO_4 , $MnSO_4$, $NaCl$, $CaCl_2$, $(NH_4)_2SO_4$. Também foram adicionados ao meio: biotina, extrato de levedura e azul de bromotimol. Entretanto, uma das características para identificação da espécie apontada pelos autores citados, é que *A. brasiliense* não precisa do fornecimento de vitaminas para crescimento.

O meio utilizado para isolamento e seleção de *A. brasiliense* era baseado no proposto por Okon & col. (14) com a diferença que o utilizado por estes autores não continha azul de bromotimol.

Em 1980, Baldani & Dobereiner (1) utilizaram meio NFB para cultivo de *A. brasiliense* e *A. lipoferum*. Este meio tem a seguinte composição, por litro: 5g ácido málico; 0,5g K_2HPO_4 ; 0,2g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,1g $NaCl$; 20mg $CaCl_2$; 2ml de solução de micronutrientes; 2ml de solução alcoólica de azul de bromotimol (5%); 4ml de Fe EDTA a 1,64%, 1ml de solução de vitaminas e 4g de KOH. O pH desse meio era ajustado para 6,8 com KOH. A composição da solução de micronutrientes é apresentado em Materiais e Métodos. A solução de vitaminas continha 10mg de biotina e 20mg de piridoxal em 100ml de água.

Diversos trabalhos foram realizados com o meio NFB (15, 20) ou com pequenas variações, como a introduzida por Tibelius & Knowles (19) que usaram solução sequestrante NaFe (Ciba-Geigy) como fonte de ferro.

Nos trabalhos de Das & Mishra (4, 5, 6, 7) e nos de Nur & col. (11, 12, 13) foi utilizado o meio proposto por Okon & col. (14). Também Nelson & Knowles (10) para o cultivo contínuo de *A. brasiliense* utilizaram meio de composição salina semelhante ao já mencionado, sem adição de azul de bromotimol e com ácido málico como fonte de carbono.

Stephan (17) introduziu importante modificação na composição do meio de cultura de *A. brasiliense* sp.7, pois usou apenas molibdênio como micronutriente, para o crescimento aeróbico e para o crescimento dependente de nitrogênio.

O efeito da adição de extrato de levedura, de peptona e de vários aminoácidos no crescimento de *A. brasiliense* com e sem fixação de nitrogênio foi estudado por Das & Mishra (5). O extrato de levedura favoreceu o crescimento em todas as concentrações, mas a nitrogenase foi fortemente reprimida pela concentração inicial de extrato de 5g/l.

O presente trabalho visa iniciar o estudo para definição de um meio de cultura adequado para o crescimento de *Azospirillum*, num processo industrial, avaliando a influência da adição de micronutrientes e de extrato e água de levedura, em cultivos com frutose como principal fonte de carbono. O trabalho objetiva também estudar a cinética de crescimento do microrganismo e determinar diversos parâmetros de interesse para o processo industrial.

Material e Métodos

Microrganismo - Foi utilizado *Azospirillum brasiliense* sp. 245 originalmente isolado de raízes de trigo cultivado na região sul do Brasil e fornecido pela Dra. Johanna Dobereiner da EMBRAPA.

Meios de cultura - Foram utilizados meios de cultura com frutose como principal fonte de carbono. A composição básica de todos os meios era (por litro): 5,0g frutose; 1,34g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$; 2,68g K_2HPO_4 ; 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,1g NaCl ; 20mg CaCl_2 ; 4ml solução Fe EDTA a 1,64%; micronutrientes: em alguns ensaios (Tabela 1) foram adicionados 2,0ml (por litro de meio) de uma solução que continha (por litro): 1g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 1,175g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,25g H_3BO_3 ; 40mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; 120mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; extrato de levedura: em alguns ensaios o meio de cultura foi enriquecido com extrato de levedura (Oxoid) em concentração de 0,1 a 1,0g/l (Tabela 1); água de levedura: em alguns ensaios foi adicionada água de levedura, preparada segundo indicação de Peppler (15) a partir de uma suspensão aquosa de fermento prensado comercial a 15% de sólidos totais: a suspensão foi deixada em repouso por 48h; o sobrenadante foi sifonado e usado no preparo do meio de cultura, considerando-se, para efeito de diluição, o teor de sólidos inicialmente presente na suspensão de fermento.

Esterilização - Todos os meios de cultura tiveram seu pH ajustado para 7,1 e foram esterilizados a 121°C por 30 minutos. A frutose foi esterilizada em separado e adicionada ao meio apenas no momento da inoculação.

Condições dos ensaios - Foi usado em todos os ensaios um incubador rotativo a 200rpm e 34°C; o pH inicial era 7,0; foram usados erlenmeyers de 1L com 200ml de meio de cultura.

Análises de acompanhamento - Em intervalos regulares eram retirados erlenmeyers do incubador rotativo e o seu conteúdo era analisado. Cada erlenmeyer retirado constituía-se em uma amostra. O valor de pH era medido em pH-metro; concentração celular determinada por filtração em membrana Millipore de 0,45µm e secagem a 85°C por 3,0h; concentração de frutose pelo método DNS (ácido dinitrosalicílico) (2); concentração de nitrogênio inorgânico por destilação por arraste de vapor, recolhimento em ácido bórico e titulação com ácido clorídrico.

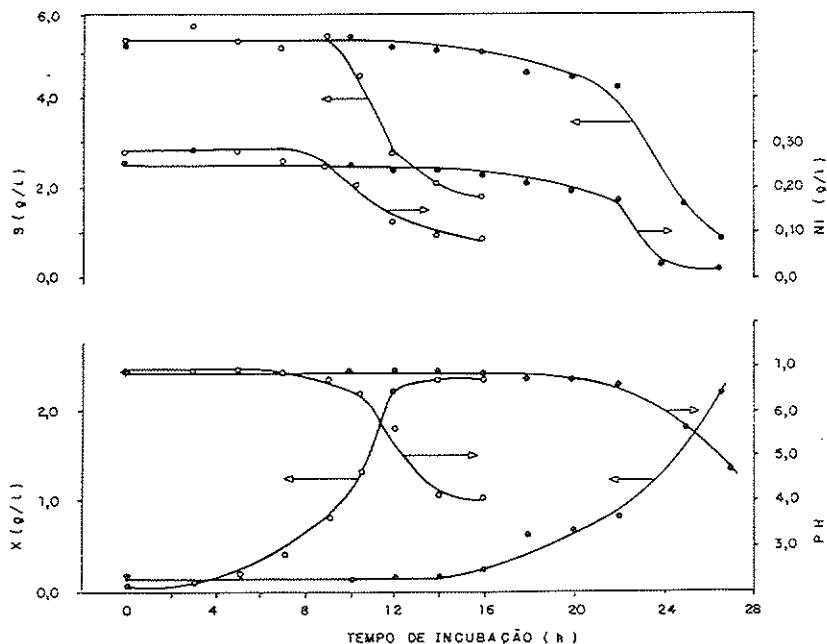
Ensaio realizados - A Tabela 1 apresenta as diferentes combinações entre micronutrientes, extrato de levedura e água de levedura utilizados na composição do

Tabela 1 - Tempo de crescimento, concentrações iniciais e finais de células (X_0 , X_f), frutose (S_0 , S_f) e nitrogênio inorgânico ($(\text{Ni})_0$, $(\text{Ni})_f$ para os diferentes ensaios, em função da composição do meio de cultura.

Símbolos: - = Sem micronutrientes, ou extrato ou água de levedura; + = Com micronutrientes; * = Gramas de sólidos totais na suspensão inicial de fermento. Ver Material e Métodos

Ensaio	Micronutrientes	Extrato de levedura (g/l)	Água de levedura (g s/l)*	Tempo de crescimento (h)	X_0 (g/l)	X_f (g/l)	S_0 (g/l)	S_f (g/l)	$(\text{Ni})_0$ (g/l)	$(\text{Ni})_f$ (g/l)
A	-	-	-	26,5	0,15	2,21	5,24	0,89	0,256	0,014
B	+	-	-	26,5	0,12	3,41	5,42	0,83	0,262	0,014
C	+	1,0	-	14,0	0,07	2,37	5,29	2,10	0,281	0,097
D	-	0,1	-	27,0	0,14	2,36	5,42	1,60	0,279	0,025
E	-	0,3	-	24,0	0,10	2,49	5,42	1,31	0,269	0,024
F	-	0,5	-	22,0	0,11	2,56	5,54	1,19	0,272	0,027
G	-	1,0	-	18,0	0,09	2,98	4,96	0,15	0,241	0,030
H	-	-	4,0	16,0	0,18	2,58	5,62	0,90	0,260	0,043
I	-	-	7,0	17,0	0,24	3,06	5,68	0,35	0,247	0,019
J	-	-	10,0	16,0	0,30	3,15	5,94	0,70	0,254	0,053

Figura 1 - Valores de pH, concentração celular (X), concentração de frutose (S) e concentração de nitrogênio inorgânico (Ni) segundo o tempo de incubação de *A. brasiliense* sp. 245.
 Símbolos: (●) = Ensaio A - (sem micronutrientes, sem ext. levedura); (○) = Ensaio C - (sem micronutrientes, com 1,0g ext. levedura)



meio de cultura de cada ensaio. De acordo com os objetivos expostos, os ensaios A e B são diretamente comparáveis para avaliação da influência de micronutrientes na ausência de extrato de levedura, enquanto os ensaios C e G permitem a mesma comparação na presença do extrato. Os ensaios A, D, E, F, G permitiram avaliar a influência de concentrações crescentes de extrato de levedura enquanto que os efeitos da água de levedura foram comparados através dos ensaios A, H, I, J.

Resultados

A Figura 1 apresenta os resultados de dois ensaios (A e C) que podem ser tomados como representativos de todos os ensaios realizados. Como se observa, há uma coincidência no comportamento das curvas que representam o pH e as concentrações de células e nitrogênio inorgânico. As mesmas mantêm-se praticamente constantes até o início da fase exponencial do crescimento de microrganismo e decaem rapidamente a partir da metade dessa fase.

A Tabela 1 apresenta, para todos os ensaios as concentrações iniciais e finais de células, frutose e nitrogênio inorgânico, bem como o tempo de crescimento para atingir a fase estacionária.

As Figuras 2 e 3 apresentam os trechos lineares dos gráficos de $\log X$ segundo o tempo de incubação, para todos os ensaios realizados, para identificação da fase exponencial do crescimento microbiano.

A partir das regressões lineares efetuadas, foram calculadas as velocidades específicas máximas (μ_{max}) para cada ensaio, que constam da Tabela 2. Nesta mesma Tabela também estão expressos parâmetros de interesse para a definição de um processo industrial: o tempo para início da fase exponencial, os fatores de conversão de frutose em células (Y_X/S) e de nitrogênio inorgânico em células (Y_X/Ni) e a produtividade celular (P_X).

Discussão dos Resultados

Influência de micronutrientes - A análise da influência dos micronutrientes pode ser feita através da comparação dos ensaios A e B (sem extrato de levedura) e C e G (com 1,0g de extrato de levedura/litro).

Como se observa das Tabelas 1 e 2 e das Figuras 2 e 4, a presença dos micronutrientes não causa diferença no crescimento celular, na ausência do extrato de levedura. Para os ensaios A e B os tempos totais de crescimento, os tempos para início da fase exponencial, os valores de μ_{max} , os fatores de conversão e as produtividades são praticamente iguais.

Na presença do extrato de levedura, notou-se uma influência bem mais pronunciada dos micronutrientes, como pode ser observado pela comparação dos ensaios C e G (Tabelas 1 e 2) e das Figuras 2 e 4. Uma primeira e importante diferença foi o menor tempo para o início da fase exponencial no ensaio C (com micronutrientes) em relação ao ensaio G e esta diferença (4h) se reflete diretamente na duração total dos ensaios.

A influência dos micronutrientes também foi positiva no aumento do fator de conversão de frutose em células e da velocidade específica máxima de crescimento. Cada um desses parâmetros no ensaio C teve um aumento de cerca de 10% em relação aos do ensaio G. Por outro lado, o fator de conversão de nitrogênio inorgânico diminuiu também em 10% na presença dos micronutrientes.

Figura 2 - Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para os ensaios com e sem micronutrientes (B, C, A, G) e com extrato de levedura (C, D, E, F, G)

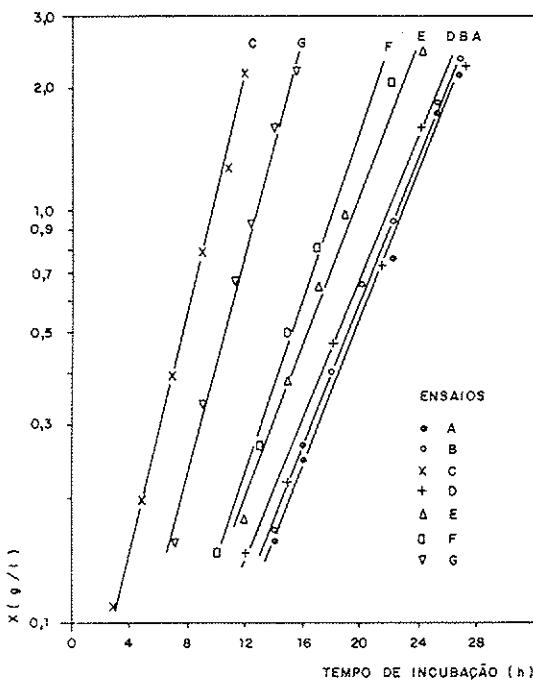


Tabela 2 - Início da fase exponencial, velocidade específica máxima de crescimento (μ_{max}), fatores de conversão de frutose (Y_X/S) e de nitrogênio inorgânico (Y_X/Ni) em células e produtividade (P_X) para todos os ensaios realizados

Ensaio	Início da fase exponencial (h)	μ_{max} (h^{-1})	Y_X/S (g/g)	Y_X/Ni (g/g)	P_X (g/l.h)
A	14,0	0,212	0,47	8,51	0,078
B	14,0	0,214	0,50	9,23	0,086
C	3,0	0,336	0,72	12,50	0,164
D	12,0	0,200	0,58	8,74	0,082
E	12,0	0,218	0,58	9,75	0,100
F	10,0	0,241	0,56	10,00	0,111
G	7,0	0,307	0,60	13,70	0,161
H	4,0	0,192	0,51	11,06	0,160
I	3,0	0,161	0,53	12,37	0,166
J	3,0	0,186	0,54	14,18	0,178

Apesar das diferenças nos outros parâmetros, a produtividade em ambos os ensaios foi praticamente idêntica (Figura 4).

Deste modo, não se pode, a priori, decidir sobre a conveniência de usar micronutrientes em conjunto com extrato de levedura. Será necessário determinar, através de um balanço econômico, se a diminuição de custos causada pelo melhor aproveitamento da fonte de carbono compensa o aumento de custos motivado pela própria adição de micronutrientes e pelo pior aproveitamento da fonte de nitrogênio.

Influência do extrato de levedura - Os ensaios com concentrações crescentes de extrato de levedura (ensaios A, D, E, F, G) apresentaram comportamento ordenado no sentido da diminuição do tempo para início da fase exponencial e do tempo total do crescimento e do aumento dos valores de μ_{max} , $Y_{X/Ni}$ e P_X . No tocante ao fator $Y_{X/S}$ houve um incremento quando a concentração de extrato de levedura passou de zero para 0,1g/l, como pode ser visto na Figura 4.

No caso do fator de conversão de nitrogênio inorgânico em células deve-se salientar que o aumento observado pode ser resultante da existência de compostos orgânicos nitrogenados, que não são dosados como nitrogênio inorgânico mas são incorporados pelas células. Assim, na verdade, o fator $Y_{X/Ni}$ neste caso não deve ser utilizado como medida da atividade metabólica ou da eficiência do aproveitamento desse nutriente.

O uso de extrato de levedura em concentrações crescentes (entre 0,1 e 1,0g/l) provocou um aumento de μ_{max} da ordem de 53,5% e na produtividade celular da ordem de 95%. Tais incrementos podem ser considerados expressivos, embora seja necessária uma avaliação econômica mais acurada para determinar se o aumento de custos provocado pela adição do extrato de levedura poderia ser compensado pela diminuição do tempo de processo e/ou pelo aumento de produtividade.

Influência da água de levedura - Na Figura 3 pode-se observar que a adição de água de levedura causa algumas modificações positivas em relação ao ensaio sem água de levedura e sem micronutrientes (ensaio A). Uma das principais é a diminuição do tempo para o início da fase exponencial, que conduz a uma diminuição do tempo de fermentação, e por consequência, um aumento de produtividade da ordem de 100% (Tabela 2).

Quando se observam as modificações causadas no crescimento celular pela adição da água de levedura em concentrações crescentes entre 4,0 e 10,0g sólidos totais/l e que estão apresentadas na Tabela 2 e nas Figuras 3 e 4, verifica-se que houve um comportamento crescente de quase todos os parâmetros ($Y_{X/S}$, $Y_{X/Ni}$, P_X); destoam desse comportamento ordenado os valores de μ_{max} para os ensaios H, I, J, embora as diferenças obtidas talvez não sejam representativas.

De forma geral (a não ser no caso de $Y_{X/Ni}$), as diferenças encontradas nos diversos parâmetros já citados não parecem ser muito significativas, pois as

Figura 3 - Concentração celular (X) segundo o tempo de incubação para os ensaios com água de levedura (H, I, J) e para o ensaio sem água de levedura e sem micronutrientes (A)

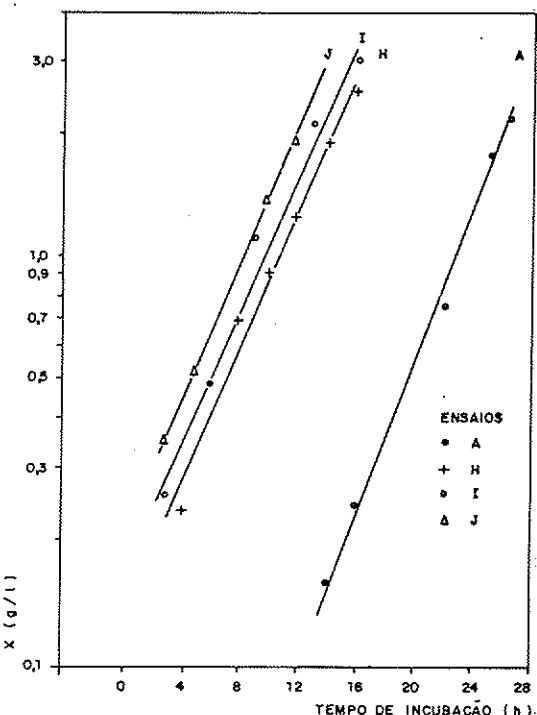
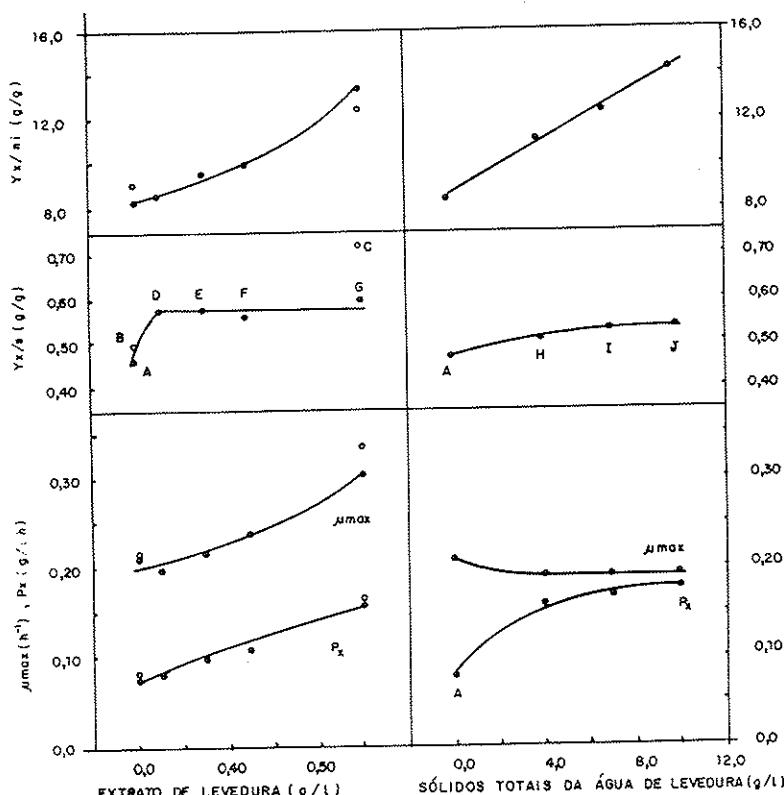


Figura 4 - Velocidade específica máxima de crescimento celular (μ_{max}), produtividade celular (P_x) e fatores de conversão de frutose ($Y_{X/S}$) e de nitrogênio inorgânico ($Y_{X/Ni}$), em células segundo a concentração de extrato de levedura e segundo a concentração de sólidos na água de levedura.

Símbolos: (●) = Sem micronutrientes; (○) Com micronutrientes



variações são inferiores a 10%, quando se passa de 4,0 para 10,0g sólidos da água de levedura/l.

No caso do fator $Y_{X/Ni}$ (em que a diferença relativa foi de 28,2%) vale a ressalva já apresentada em relação à existência de compostos orgânicos nitrogenados.

Comparação entre extrato de levedura e água de levedura - A adição de água de levedura ou de extrato de levedura aos meios para crescimento de *A. brasiliense* sp. 245, conduziu, em alguns casos, a resultados semelhantes. Assim, comparando-se o ensaio G (com extrato de levedura) com os ensaios I e J (com água de levedura) observou-se que, com exceção dos valores de μ_{max} e dos tempos para inicio da fase exponencial, os demais parâmetros são da mesma ordem de grandeza, inclusive quanto ao fator $Y_{X/S}$ e à produtividade celular.

Com relação à produtividade é interessante observar que no caso dos ensaios H, I e J, que apresentaram valores de μ_{max} bem inferiores ao valor de μ_{max} do ensaio G, houve uma espécie de compensação, pois a água de levedura fez com que o microrganismo iniciasse precocemente o crescimento exponencial, o que levou os quatro ensaios a apresentarem tempos finais e produtividades praticamente idênticos.

Também para uma definição com vista à utilização industrial entre extrato ou água de levedura, será necessário levar em consideração os aspectos econômicos da aquisição das matérias-primas e do custo de processamento para a obtenção da água de levedura.

Agradecimentos

Costaríamos de agradecer à Dra. Johanna Dobereiner da EMBRAPA, pelo fornecimento da cepa e pelas sugestões; e aos alunos Solange Sabra e Luiz Fernando Martins Cordeiro da Engenharia Química da EPUSP pela colaboração na realização de alguns ensaios.

Referências Bibliográficas

1. Baldani, V.L.D. & Dobereiner, J. - Host plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Bioch.*, 12:433-439, 1980.
2. Bernfeld, P. - Amylases α and β . In: - Colowich, S.P. & Kaplan, N.O. - Methods in enzymology. New York, v.1, 1955.
3. Boddry, R.M. & Dobereiner, J. - Nitrogen fixation associated with grasses and cereals. In: - Rao, N.S.S., ed. - Current developments in biological nitrogen fixation. New Delhi, Oxford & IBH Publishing, p.277-313, 1984.
4. Das, A. & Mishra, K.A. - Effect of inorganic nitrogen sources on growth & acetylene reduction in *Azospirillum brasiliense*. *Ind. J. Exp. Biol.*, 20:590-594, 1982.
5. Das, A. & Mishra, K.A. - Effect of yeast extract, casamino acids, peptone & various L-amino acids on growth & acetylene reduction in *Azospirillum brasiliense*. *Ind. J. Exp. Biol.*, 20:751-755, 1982.
6. Das, A. & Mishra, K.A. - Utilization of fructose by *Azospirillum brasiliense*. *Can. J. Microbiol.*, 29:1213-1217, 1983.
7. Das, A. & Mishra, K.A. - Various physiological aspects associated with metabolism of fructose and malate in *Azospirillum brasiliense*. *Ind. J. Exp. Biol.*, 22:536-538, 1984.
8. Dobereiner, J. - Ten years *Azospirillum*. *Experientia Suplementum*, 48:9-22, 1983.
9. Dobereiner, J. - Fixação biológica de nitrogênio. In: - Energia na agricultura: tecnologias poupadoras de insumos. Integração de sistemas energéticos: produção de alimentos. Jaboticabal, SP, FUNEP, p.155-173, 1985.
10. Nelson, L.M. & Knowles, R. - Effect of oxygen and nitrate on nitrogen fixation and denitrification by *Azospirillum brasiliense* in continuous culture. *Can. J. Microbiol.*, 24:1395-1403, 1978.
11. Nur, I.; Steinitz, Y.; Okon, Y. & Henis, Y. - Carotenoid composition and function in nitrogen fixing bacteria of the genus *Azospirillum*. *J. Gen. Microbiol.*, 122:27-32, 1981.
12. Nur, I.; Okon, Y. & Henis, Y. - Effect of dissolved oxygen tension on production of carotenoids, poly- β -hydroxybutyrate, succinate-oxidase and superoxide dismutase by *Azospirillum brasiliense* in continuous culture. *J. Gen. Microbiol.*, 128:2937-2943, 1982.
13. Nur, I.; Okon, Y. & Henis, Y. - The role of oxygen concentration in the synthesis of carotenoids, poly- β -hydroxybutyrate and succinate oxidase in continuous culture of *Azospirillum*. *Israel J. Bot.*, 31:221-227, 1982.
14. Okon, Y.; Albrecht, S.L. & Burris, R.H. - Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.*, 127:1248-1254, 1976.
15. Pedrosa, F.O.; Stephan, M.; Dobereiner, J. & Yates, M.G. - Hydrogen-uptake hydrogenase activity in nitrogenfixing *Azospirillum brasiliense*. *J. Gen. Microbiol.*, 128:161-166, 1982.
16. Peppier, H.J. - Yeast extracts. - In: - Rose, A.H., ed. - Economic microbiology. London, Academic Press, p.293-312, 1982.

17. Stephan, M.P. - Crescimento anaeróbico dependente de NO₂ e N₂O em *Azospirillum brasiliense* sp. 7. Rio de Janeiro, UFRJ, 1983. (Dissertação de Mestrado).
18. Tarrand, J.J.; Krieg, N.R. & Dobereiner, J. - A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasiliense* sp. nov. Can. J. Microbiol., 24:967-980, 1978.
19. Tibelius, K.H. & Knowles, R. - Effect of hydrogen and oxygen on uptake-hydrogenase activity in nitrogen fixing and ammonium-grown *Azospirillum brasiliense*. Can. J. Microbiol., 29:1119-1125, 1983.
20. Yates, M.G.; Walker, C.C.; Partridge, C.P.D.; Pedrosa, F.O.; Stephan, M. & Dobereiner, J. - H₂ metabolism and nitrogenase activity in *Azotobacter chroococcum* and *Azospirillum brasiliense*. In: - Current perspectives in nitrogen fixation. Canberra, Australian Acad. Sci., p.97-100, 1981.

EVALUATION OF A FLUORESCENT METHOD IN THE STUDY OF THE VIABILITY OF CANDIDA ALBICANS STRAINS

Benedito Corrêa
Adhemar Purchio
Claudete Rodrigues Paula
& Walderez Gambale

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

Summary

The effectiveness of the fluorescent viability test (fluorescein diacetate FDA and ethidium bromide-EB-solution) compared to the plaque counting test (Miles & Misra M&M) was performed on 10 samples of *Candida albicans* cultivated in Sabouraud dextrose agar at 25°C. An ideal incubation period of 45 minutes was found. Growth curves of the fungi strains studied based on the mean cell number were drawn for both the FDA & EB and M&M methods. The statistical evaluation (Student's T test) of the average sum of the viable cell counts showed that the FDA-EB method is more sensitive than the M&M test for the studied species. The growth curves of the samples usually followed a homogeneous pattern comparable to others provenient from non-dimorphic fungi.

Resumo

Avaliação da eficácia do método de fluorescência no estudo de viabilidade de amostras de Candida albicans

Avaliou-se a eficácia do método de viabilidade através da fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína (AF) e brometo de etidio (BE), frente ao método da contagem de colônias em placas (Miles & Misra) relativamente a 10 amostras de *Candida albicans* cultivadas em ágar-Sabouraud glicose, a 25°C. O prazo ideal de incubação das células com os corantes foi de 45 minutos. Elaborou-se curvas de crescimento das amostras estudadas, com base na média do número de células viáveis determinadas pelos dois métodos. A análise estatística (Teste T de Student) da somatória das médias das contagens de células viáveis demonstrou que o método AF-BE apresenta maior sensibilidade do que o de Miles & Misra, para a espécie estudada. As curvas de crescimento apresentadas pelas amostras seguem, via de regra, um perfil homogêneo de comportamento em relação a outros fungos não dimórficos.

Introduction

There are few known methods used to determine the viability of cells. Some of these include different cytotoxic dyes such as Y eosin and trypan blue (11), methylene blue (16), Mg-ANS-magnesium salt of 1-anilino-8 naphtalene sulfonic acid (16), INT 2-(p-iodophenyl) - 3 (p-nitrophenyl) 5-phenyltetrazolium chloride (16).

and Janus green B (1).

Fluorescein diacetate (FDA) has been used in mammalian cell viability assays (14). Living cells have the capacity of accumulating fluorescein diacetate esters (fluorochromasia). Based on this property a new alternative method was established leading to, for example, fungi culture viability determination (15), fluorescent staining of bacteria (3) and soil microorganism (15).

Another fluorescent compound ethidium bromide (EB) was used in cytotoxic test (5). This substance rapidly enters damaged cells forming a fluorescent compound when bound to nuclear material through intercalation (17).

This binding results in mitochondrial abnormalities of various cell types, including yeasts (6).

An association of both fluorescent substances (FDA-EB) was used to determine viability of mycobacteria (7) and fungi cells (4, 12, 13). The FDA-EB method was referred to, with enthusiasm, by some authors because of the many possibilities this fast high sensitive technique permits.

Considering the above, the present investigation aims to: standardize the FDA-EB technique for *Candida albicans* cultures, establish growth curves of ten samples, using colony counting and FDA-EB fluorescent test to quantify viable cells, and determine the sensitivity of the fluorescent method when compared to the colony counting method.

Material and Methods

Organisms tested - Ten samples of *Candida albicans* from the fungi culture collection of the Mycology Section of the Department of Microbiology of the Institute of Biomedical Sciences (ICB), University of São Paulo were used during the development of this investigation.

Cultures were numbered as follows: 1(ICB-7); 2(ICB-11); 3(ICB-12); 4(ICB-4); 5(ICB-58); 6(ICB-61); 7(ICB-69); 8(ICB-70); 9(ICB-129) and 10(ICB-131). All samples were obtained from clinical material, characterized through routine mycological methods (8) and kept in Sabouraud dextrose agar at 25°C.

Reagents and solutions - A stock solution of fluorescein diacetate (3,6, diacetyl fluorescein-Calbiochem, Los Angeles, U.S.A.) was prepared in acetone at a final concentration of 5mg/ml and kept at -20°C.

A second stock solution of ethidium bromide (2,7 diamino-10 ethyl-9 phenylphenanthridinium bromide; Sigma, St. Louis, Missouri, U.S.A.) was prepared at a concentration of 1000µg/ml of phosphate buffered saline, pH 7,4 (PBS) and stored at -20°C.

Before use, FDA and EB solutions were diluted in PBS 2500X and 20X respectively, using equal volumes of the diluted solutions.

Virulence determination - Homogeneous suspensions of the *Candida albicans* samples in phosphate buffered saline (PBS) were inoculated intravenously in 10 male rabbits ear marginal vein.

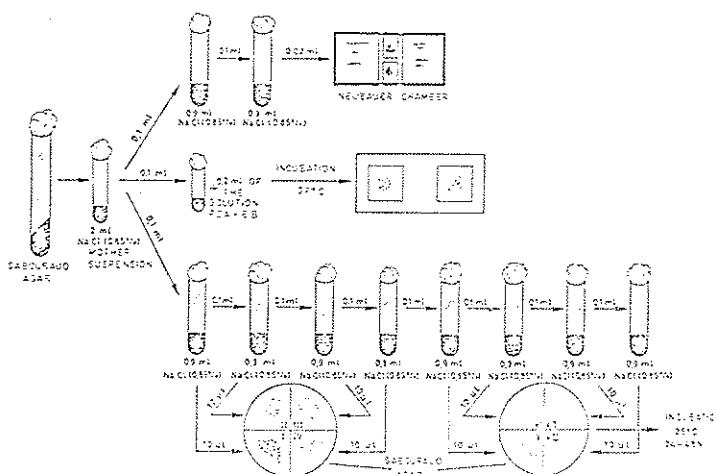
Viability tests - An initial suspension in saline (0.85% NaCl) was prepared from each sample and assayed by both the Miles & Misra - test (10) and total cells counts was performed using Neubauer chamber. Aliquots of 0.1ml of the initial suspension were mixed with equal volume (v/v) of FDA & EB in PBS solution, previously prepared.

The resulting solution was incubated at different periods (15, 30, 45, 50, 60, 90 and 150 minutes). When the established time interval had elapsed a drop of the microorganism suspension and reagents were mixed, set between slide and cover slip and examined under the fluorescence microscope (Figure 1).

One hundred (100) fluorescent cells were counted on each prepared slide.

The number of viable cells (apple green fluorescence) was compared to the total number of cells counted on the Neubauer chamber and the number of viable cells per ml of the original suspension was determined.

Figure 1 - Viability test: total cell counts in a Neubauer Chamber, FDA-EB and Miles & Misra (1970)



The experiments were performed on 15h to 13 day old culture of all samples. Growth curves of all fungi samples were studied based on the number of viable cells determined through the FDA-EB and M&M methods. Four counts were performed for every sample.

Results were statistically analyzed using Student's T test (2) in order to compare the sensitivity of the fluorescent and the colony counting methods.

Results

All samples of *C. albicans* used were pathogenic for rabbits. Dead *C. albicans* cells showed a bright light red stain with a slightly greater intensity at the cell wall. On the other hand, viable cells showed an intense green fluorescent ring at the cell wall region.

It was however noticed that fluorescence was concentrated at one point inside the viable cells and that the surrounding intracellular components showed a weak fluorescent staining.

After studying the different contact time periods between cells and dyes solutions, an optimum differentiation was established after 45 minutes (Figure 2).

Once the ideal technical working conditions of the fluorescent test had been determined, the viable cells were counted and, with the obtained values, growth curves were established.

Through the statistical analysis of the sum of the mean values resulting from the viable cell by the proposed methods, it was concluded that all points lay on the growth curve (Table 1).

The curves drawn from both viability methods were correlated during all phases. The lag phase was not observed in any sample. The logarithmic growth phase of *Candida albicans* began at 15 hours reaching its peak on the fourth day in the fluorescent method and on the third day by across of the Miles & Misra method (Figure 3).

Discussion

Dead *C. albicans* cell showed an uniform red fluorescence when EB was used as a dye. Viable cells when stained with fluorescein diacetate showed well defined and

intensely green fluorescence at the cell wall and vacuolar region. Curiously enough, these regions have been believed to harbor acetyl esterase activity (9). Consequently it is assumed that structures containing these enzymes showed intense fluorescence.

Gradual enhancement of fluorescence was observed in all samples with 30 minutes of contact. This enhancement effect was no longer observed at 60 minutes of contact, when the background was becoming fluorescent and cells with both fluorescent patterns could be seen. These factors made it hard to distinguish between viable and dead cells.

The relationship between fungi kinetics and the staining pattern was established. A decrease in the fluorescence of samples cultivated following the log phase was observed probably due to the decreased metabolic activity of cells. Conversely, from the initial growth phase up to the logarythmic phase, an enhanced fluorescence was seen. This has been observed by other authors (13, 15). The high sensitivity of the FDA-EB test permits individual cell count, even with reduced number, which makes this the most adequate test for the study of cultures with low cell density development.

Some analytical restrictions were seen with the M&M methods which are worth mentioning. When the suspension used is not homogeneous, clumping and colony aggregation may occur reducing the final colony count.

Table 1 - Comparative statistical analysis* of the summation of the means of viable cells count distributed in the critical intervals of the viability curves of *Candida albicans* (FDA-EB and M & M methods). *Student's T test with the same variances confirmed by F test.

Symbols: V = Variance; SD = Standard deviation; SE = Standard error; $T_{c0,05}$ = Critical with significance $\alpha = 0,05$; U = Urelation; S = Significant

Days	Methods	Mean	V	SD	SE	$T_{c0,05}$	U	Significance
1	FDA - EB	24,67	188,63	13,73	2,17	1,96	3,36	S
	M & M	15,97	88,53	9,40	1,48			
2	FDA - EB	44,97	214,7	14,65	2,31	1,96	4,52	S
	M & M	29,9	228,65	15,12	2,39			
3	FDA - EB	49,82	302,47	17,39	2,74	1,96	4,47	S
	M & M	34,47	168,25	12,97	2,05			
4	FDA - EB	56,02	588,8	24,26	3,83	1,96	5,06	S
	M & M	31,8	327,8	18,1	2,86			
5	FDA - EB	44,87	397,03	19,92	3,15	1,96	4,69	S
	M & M	28,07	114,37	10,69	1,69			
6	FDA - EB	32,42	245,84	15,67	2,47	1,96	4,14	S
	M & M	19,5	142,3	11,92	1,88			
7	FDA - EB	28,64	229,83	15,16	2,39	1,96	5,02	S
	M & M	14,9	70,09	8,37	1,32			
8	FDA - EB	18,19	81,09	9,0	1,42	1,96	4,36	S
	M & M	11,12	23,85	4,88	0,77			
9	FDA - EB	15,8	87,36	9,34	1,47	1,96	4,67	S
	M & M	8,32	15,04	3,87	0,61			
10	FDA - EB	9,28	39,63	6,29	0,99	1,96	2,86	S
	M & M	5,97	13,81	3,71	0,58			
11	FDA - EB	6,59	24,81	4,98	0,78	1,96	3,42	S
	M & M	3,57	6,35	2,52	0,39			
12	FDA - EB	4,91	20,09	4,48	0,7	1,96	2,89	S
	M & M	2,62	4,9	2,21	0,35			
13	FDA - EB	3,18	7,43	2,72	0,43	1,96	3,63	S
	M & M	1,4	2,14	1,46	0,23			

Figure 2 - Viable and dead cells of *Candida albicans* incubated during 45 minutes in a fluorescein diacetate and ethidium bromide solution (x 800)

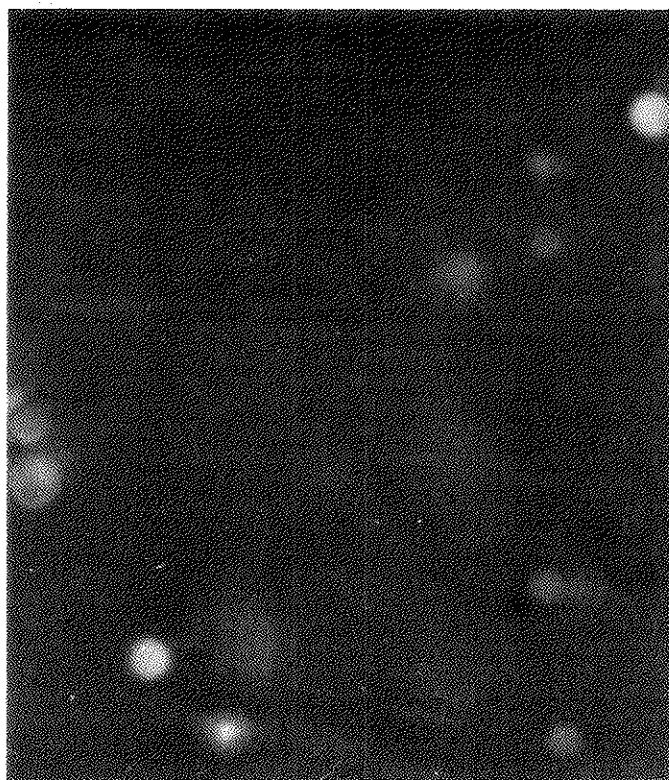
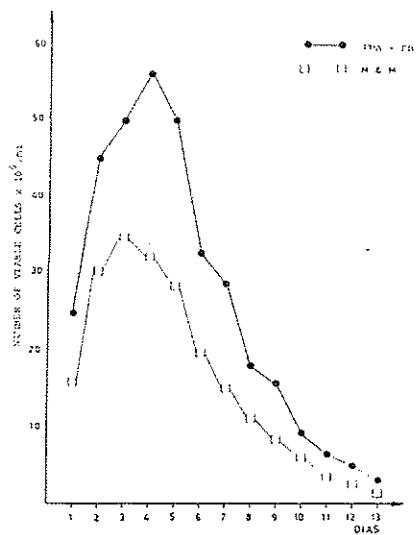


Figure 3 - Distribution of the summation means of viability determinations realized between the 1st and 13th day of culture, from 10 samples of *Candida albicans*, utilizing the methods FDA-EB and M & M, in Sabouraud-dextrose agar, at 25°C



On the other hand, during the reduction of the growth phase, when a progressive induction of cells is usually seen, the subsequent dilutions may even further restrict the uprising of new colonies. This explains the null values obtained through method.

From what has been said we are able to affirm that the fluorescent method is an important help for the mycologist because of it's high sensitivity and rapid reproducibility.

References

1. Berliner, M.D. & Rega, M.E. - Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus green B. *Sabouradia*, 5:26-29, 1966.
2. Bowker, A.H. & Lieberman, G.J. - Handbook of industrial statistics. New Jersey, Prentice Hall, 1955.
3. Brunius, G. - Technical aspects of the use of 3', 6'-diacetyl fluorescein for vital fluorescent staining of bacteria. *Curr. Microbiol.*, 4:321-323, 1980.
4. Calich, V.L.G.; Purchio, A. & Paula, C.R. - A new fluorescent viability test for fungi cells. *Mycopathologia*, 66:175-177, 1978.
5. Edidin, M. - A rapid quantitative fluorescence assay for cell damage by cytotoxic antibodies. *J. Immunol.*, 104:1303-1306, 1970.
6. Goldring, E.S.; Grossman, L.I.; Krupnick, D.; Cryer, D.R. & Maxmur, J. - The petite mutation in yeast: loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petites with ethidium bromide. *J. Mol. Biol.*, 52:323, 1970.
7. Jarnagin, J.L. & Luchsinger, D.W. - The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol.*, 55:253-259, 1980.
8. Lodder, J. - The yeast: a taxonomic study. 2.ed. Amsterdam, Elsevier, 1970.
9. Medzon, E.L. & Brady, M.L. - Direct measurement of acetylesterase in living protest cells. *J. Bacteriol.*, 97:402-415, 1969.
10. Miles & Misra - In: - Lapace, S.; Shelton, J.E. & Mitchell, T.G. - Methods in microbiology. London, Norris Ribbons, vol.3A, p.1-133, 1973.
11. Mittal, K.K.; Mickey, M.R.; Singal, D.P. & Terasaki, P.I. - Serotyping for homo-transplantation. *Transplantation*, 6:913-927, 1968.
12. Restrepo, A.; Cano, L.E.; Bedout, C.; Brummer, E. & Stevens, A.D. - Comparison of various techniques for determining of *P. brasiliensis* yeast form cells. *J. Clin. Microbiol.*, 16:209-211, 1982.
13. Rojas Pedral, M.M.E. - Avaliação da eficiência do método de fluorescência (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de células leveduriformes de *Sporothrix schenckii*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, USP, 1983. (Dissertação de Mestrado).
14. Rotman, B. & Papermaster, B.W. - Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolyses of fluorogenic esters. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, 55:134-141, 1966.
15. Sodestrom, B.E. - Vital staining of fungi in pure cultures and in soil with fluorescein diacetate. *Soil. Biol. Biochem.*, 9:59-63, 1977.
16. Trevors, J.T.; Merrick, R.L.; Russell, I. & Stewart, G.G. - A comparison of methods for assessing yeast viability. *Biotechnology Letters*, 5:131-134, 1983.
17. Waring, M.J. - Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J. Mol. Biol.*, 13:269-282, 1965.

MÉTODO RÁPIDO PARA A TRIAGEM DE FUNGOS AMILOLÍTICOS E SEUS MUTANTES

José Abrahão Neto
& Bruno Carlos de Almeida Cunha

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

Resumo

O trabalho estabelece correlações entre atividade amilolítica em meios sólido e líquido com o objetivo de otimizar a triagem de fungos amilolíticos. A cepa *Aspergillus oryzae* NRRL 692 e dois mutantes, oriundos de exposição à radiação ultra-violeta, foram cultivadas em meio sólido e as medidas de atividade foram obtidas da relação (I) entre área do halo de degradação e área preenchida pela colônia. A melhor correlação com a atividade em meio líquido (U) foi proporcionada pela plotagem de log I versus U.

Summary

Simplified method for amylolytic fungi screening

This paper proposes to establish correlations between the activity of amylase in solid and liquid medium in order to expedite screening procedure. *Aspergillus oryzae* NRRL 692 and two mutants, obtained from exposition to U.V. radiation, were incubated in solid medium and the amylolytic activity was calculated from relation (I) between area of degradation zone and area covered by the colony. The best correlation with liquid medium (U) was given by plotting log I versus U.

Introdução

A importância adquirida, na década atual, pelas enzimas amilolíticas tem aumentado principalmente pela aplicação no programa nacional do álcool na obtenção de álcool de materiais amiláceos. Ao lado desta aplicação, há várias com potencial industrial tais como: panificação, têxtil, xaropes com alto conteúdo de glicose, etc.

Isto justifica todo esforço no sentido de um melhor entendimento no aproveitamento e obtenção destas enzimas economicamente muito importantes para nosso país.

Este trabalho propõe determinar valores de correlação entre as atividades enzimáticas em meio sólido e líquido de mesma composição, procurando tornar a avaliação de fungos amilolíticos facilitada pela sua quantificação indireta.

Material e Métodos

- Cepa - *Aspergillus oryzae* NRRL 692
- Lâmpada U.V. - Tohwa G-15 T8

Tabela 1 - *Aspergillus oryzae* NRRL 692, medidas de halo de hidrólise em meio sólido (cm).

Símbolos: SA e SB = *A. oryzae* NRRL 692; 5E e 7E = Mutantes; O diâmetro das colônias foi obtido da média de duas leituras tomadas em perpendicular; I = Área do halo/Área da colônia

Microrganismos	Leituras - Diâmetro (cm)	Média	I
SA	Halo - 3,51; 3,50; 3,45; 3,45; 3,43 Colônia - 2,775	3,467	1,56
	3,43; 3,50; 3,46; 3,44; 3,50		
SB	Halo - 3,42; 3,40; 3,40; 3,49; 3,38 Colônia - 2,775	3,411	1,51
	3,40; 3,45; 3,32; 3,42; 3,43		
5E _A	Halo - 3,25; 3,12; 3,21; 3,21; 3,20 Colônia - 1,72	3,207	3,48
	3,16; 3,22; 3,24; 3,24; 3,20		
5E _B	Halo - 3,22; 3,22; 3,22; 3,23; 3,27 Colônia - 1,765	3,229	3,35
	3,20; 3,20; 3,27; 3,23; 3,23		
7E _A	Halo - 3,36; 3,30; 3,36; 3,30; 3,35 Colônia - 2,41	3,336	1,92
	3,36; 3,37; 3,30; 3,35; 3,31		
7E _B	Halo - 3,78; 3,16; 3,75; 3,12; 3,78 Colônia - 2,525	3,462	1,88
	3,15; 3,78; 3,18; 3,75; 3,17		

- Espectrofotômetro - Bausch-Lomb, Espect. 70
- Shaker-Controled Inviroment Incubator Shaker Mod. 25 - New Brunswick
- Meio Czapek modificado (CM) - NaNO₃ 0,3%; K₂HPO₄ 0,1%; MgSO₄.7H₂O 0,05%; KC₁ 0,05%; Dextrina 2,0%; FeSO₄ 0,001% e Agar-Agar 2%
- Amido solúvel (1%) - tamponado em pH 5,5 (A.S.)
- Membrana filtrante (Millipore - 0,45; 47mm)
- Disco de papel de filtro com 5mm de diâmetro

Através de exposição à radiação ultravioleta obtiveram-se dois mutantes designados (5E e 7E) do fungo *Aspergillus oryzae*. Uma solução com 10⁷ esporos/ml foi irradiada por 60 segundos, tempo esse necessário para que houvesse 99,9% de morte.

Placas de Petri com o meio CM foram inoculadas com suspensões de esporos de *Aspergillus oryzae* NRRL 692 e seus mutantes 5E e 7E. Depois de incubados a 30°C/72h foram submetidas à revelação com lugol 0,01N (Tabela 1).

Partindo-se de uma concentração conhecida de esporos, dos mutantes e amostra selvagem inoculou-se erlenmeyers contendo 50ml de CM, que foram incubados em Shaker a 150 RPM; 30°C/72h.

O micélio foi separado através de membrana filtrante e sua massa seca está apresentada na Tabela 2.

A atividade do filtrado foi determinada por açúcares redutores totais (ART) produzidos a partir de solução de amido solúvel (AS), com ácido di-nitrosalicílico (1, 6, Tabela 2). Em placas de Petri com CM foram depositados discos de papel embebidos no filtrado do qual 15µl foram colocados em furos cilíndricos previamente produzidos nas placas (Tabelas 3 e 4). Após 48h em estufa a 30°C os halos de degradação da dextrina foram revelados adicionando-se 5ml de lugol 0,01N e deixando-se em contato por 1 minuto, após esse tempo o excesso de lugol foi descartado e as placas colocadas em estufa a 30°C por 10 minutos. Os valores obtidos, pelos diâmetros do halo formado e divididos pelas massas secas correspondentes encontram-se na Tabela 5.

Tabela 2 - *Aspergillus oryzae* NRRL 692, medidas de atividade em meio líquido, relacionados com I e log I.

Símbolos: S = *A. oryzae* NRRL 692; 5E e 7E = Mutantes; * = Média das duas leituras de absorbância

Microrganismos	I	Absorbância	A.R. = Açúcares redutores (mg)	Massa seca (MS) (mg)	A.R./M.S. (U)	log I
S _A	1,56	0,425*	0,225	0,1060	2,099	0,193125
S _B	1,51	0,41*	0,2158	0,1055	2,046	0,178977
5E _A	3,48	0,41*	0,2158	0,0708	3,048	0,541579
5E _B	3,35	0,46*	0,2382	0,0800	2,977	0,525045
7E _A	1,42	0,38*	0,2024	0,0810	2,499	0,383301
7E _B	1,88	0,33*	0,1801	0,0740	2,434	0,274158

Resultados e Discussão

Os valores para a relação halo/colônia (I) obtidos para o fungo *Aspergillus oryzae* NRRL 692 e seus mutantes podem ser vistos nas Tabelas 1 e 2. Pode-se observar que os diâmetros dos halos de degradação permaneceram quase constantes com pequenas variações entre eles. Outrossim, pelo valor I nota-se que os mutantes tiveram uma atividade maior relativamente à cepa selvagem.

Pela Tabela 2 pode-se observar que também em meio líquido os mutantes 5E e 7E mostraram ter uma atividade (U) média de aproximadamente 45% e 19% maior em relação à cepa selvagem.

Os valores de atividade em meio sólido utilizando as técnicas de disco de papel e poços cilíndricos estão colocados nas Tabelas 3, 4 e 5 sendo nesta última relacionados com a atividade em meio líquido (U). Estas técnicas permitiram uma melhor compreensão do comportamento da catálise enzimática em meio sólido quando este é correlacionado com a atividade em meio líquido.

Do ponto de vista teórico a análise da atividade em meio sólido envolve fenômenos difusoriais tais como: a interação de um complexo de moléculas, como a mistura de enzimas, secretadas pelos microrganismos e os produtos da catálise, oligossacarídeos de alto e baixo pesos moleculares. Essa interação sofre a influência de outros fatores, por exemplo, temperatura e concentração de substrato.

Do ponto de vista prático existem, na literatura, várias propostas de determinação da atividade enzimática por difusão radial em meio sólido. Os autores utilizam amido, amilose, complexos coloridos de amido ou amilose como substrato, e chegam a conclusão que há uma correlação entre a concentração da solução enzimática e a zona de degradação do substrato (2, 4, 5, 7).

A reação em meio sólido parece ser mais homogênea uma vez que os oligossacarídeos de baixo peso molecular se difundem para fora da zona de degradação e os de alto peso molecular se difundem a uma taxa mais lenta que a enzima. O mesmo não acontece em sistemas como meio líquido em tubo de ensaio onde todos os tipos de produtos da hidrólise ainda são passíveis de catálise pela enzima, sendo os oligossacarídeos de baixo peso molecular aqueles que se ligam à enzima com menores energias de ligação.

Tabela 3 - *Aspergillus oryzae* NRRL 692. Diâmetro de halos de hidrólise (discos de papel embebidos em filtrado).

Símbolos: S = *A. oryzae* NRRL 692; 5E e 7E = Mutantes

Microrganismos	Diâmetro dos Halos (cm)	Média (M)	Desvio padrão
S _A	- 2,28; 2,28; 2,29; 2,27; 2,28 - 2,28; 2,28; 2,28; 2,28; 2,28	2,280	0,005
S _B	- 2,23; 2,23; 2,23; 2,23; 2,23 - 2,23; 2,23; 2,23; 2,23; 2,23	2,230	0
5E _A	- 2,20; 2,29; 2,31; 2,29; 2,31 - 2,29; 2,31; 2,30; 2,30; 2,30	2,300	0,008
5E _B	- 2,35; 2,35; 2,35; 2,35; 2,35 - 2,35; 2,35; 2,35; 2,35; 2,35	2,350	0
7E _A	- 2,30; 2,30; 2,30; 2,30; 2,30 - 2,30; 2,30; 2,30; 2,30; 2,30	2,300	0
7E _B	- 2,12; 2,12; 2,12; 2,12; 2,12 - 2,11; 2,12; 2,12; 2,13; 2,12	2,120	0,003

Consequentemente, estes fatos limitam a relação linear entre os produtos de liberação da catálise e a atividade enzimática em meio líquido (3).

O que parece não haver é um consenso quanto aos parâmetros utilizados para a correlação da concentração enzimática e zona de degradação. Ora utiliza-se a concentração e ora o seu log, o mesmo acontece com a zona de degradação com o uso dos parâmetros raio, quadrado do raio, diâmetro, quadrado do diâmetro e também área. Levando-se isto em consideração e também o fato que neste trabalho utilizam-se parâmetros específicos como I, fica evidente a necessidade de uma análise particularizada das possíveis correlações entre as atividades dos meios sólido e líquido, resumidos na Tabela 6.

Observa-se pelas correlações entre as técnicas de pogo cilíndrico e discos de papel com atividade (U) no meio líquido (Tabela 6), que a utilização da área de degradação no meio sólido proporciona valores mais elevados de r (0,984 e 0,962) do que os obtidos com o diâmetro (0,969 e 0,917).

No caso de colônias, quando se leva em conta somente os valores de diâmetro dos halos e áreas dos halos de degradação correlacionando-os com (U), constatamos que os valores de r são respectivamente 0,902 e 0,523. Este fato indica a propriedade da relação proposta (área do halo/área da colônia), obtendo-se assim valores de r mais elevados.

A análise destes dados abre também a possibilidade da utilização alternativa de quantificação direta da atividade produzida em meio líquido, considerando-se a área de degradação produzida por uma determinada alíquota da solução a ser analisada, no meio sólido proposto (CM).

Ainda pela Tabela 6 podemos observar que os parâmetros I ou log I apresentam-se com um coeficiente de correlação (r) de 0,969 e 0,985 respectivamente, com a atividade em meio líquido (U).

Tabela 5 - *Aspergillus oryzae* NRRL 692, valores compilados das Tabelas 2, 3 e 4 relacionando medidas de atividade amilolíticas em meios sólidos e líquido.

Símbolos: S = *A. oryzae* NRRL 692; 5E e 7E = Mutantes

Tabela 4 - *Aspergillus oryzae* NRRL 692. Diâmetros de halos de hidrólise (pogo cilíndrico).

Símbolos: S = *A. oryzae* NRRL 692; 5E e 7E = Mutantes

Microrganismos	Diâmetro dos halos (cm)	Média (M)	Desvio padrão
S _A	- 2,40; 2,42; 2,42; 2,40; 2,40 - 2,42; 2,42; 2,40; 2,40; 2,40	2,408	0,010
S _B	- 2,23; 2,23; 2,23; 2,23; 2,23 - 2,23; 2,23; 2,23; 2,23; 2,23	2,230	0
5E _A	- 2,45; 2,43; 2,45; 2,44; 2,45 - 2,44; 2,44; 2,44; 2,45; 2,45	2,444	0,007
5E _B	- 2,51; 2,52; 2,50; 2,51; 2,51 - 2,52; 2,51; 2,51; 2,51; 2,50	2,514	0,007
7E _A	- 2,23; 2,23; 2,23; 2,23; 2,23 - 2,23; 2,23; 2,23; 2,23; 2,23	2,230	0
7E _B	- 2,12; 2,12; 2,12; 2,12; 2,12 - 2,12; 2,12; 2,12; 2,12; 2,12	2,120	0

Microrganismos	(Disco) U	(Disco) Diâm. halos M.S.	(Pogo) Diâm. halos M.S.	(Disco) Área halos M.S.	(Pogo) Área halos M.S.
S _A	2,099	21,509	22,717	38,517	42,963
S _B	2,046	21,137	21,137	37,021	37,021
5E _A	3,048	32,486	34,520	58,683	66,261
5E _B	2,977	29,375	31,425	54,217	62,048
7E _A	2,499	28,395	27,531	51,293	48,219
7E _B	2,434	28,649	28,649	47,701	47,701

Tabela 6 - *Aspergillus oryzae* NRRL 692.
Correlações entre atividade do meio líquido e sólido

Relações (X × Y)	Coeficiente de correlação linear (r)	Equação da reta por regressão linear
I × U	0,969	$U = 0,45982 I + 1,46725$
log I × U	0,985	$U = 2,59160 \log I + 65495$
Poco		
D. halos M.S. × U	0,969	
Disco		
D. halos M.S. × U	0,917	
Poco		
Área halos M.S. × U	0,984	
Disco		
Área halos M.S. (Colónia) × U	0,962	
Diâmetros de halo para cálculo de I × U	0,902	
Área de halo para cálculo de I × U	0,523	

Conclusões

Na comparação da atividade amilolítica em meios sólido e líquido observa-se:
 1. A área de degradação em meio sólido apresenta melhor correlação com a atividade em meio líquido (U) do que o diâmetro da zona de degradação. No caso da área, os índices de correlação variaram entre 0,962 e 0,984. Para o diâmetro, o intervalo foi de 0,917 a 0,969; 2. No caso de colônias a relação área, atividade em meio líquido apresentou um índice = 0,523. Considerando-se o diâmetro do halo, o índice atingiu 0,902; 3. Utilizando-se o parâmetro $I = \frac{\text{área de degradação}}{\text{área de colónia}}$, $U = 0,45982 I + \frac{\text{área de colónia}}{1,46725}$ ($r = 0,969$) ou $U = 2,59160 \log I + 1,65495$ ($r = 0,985$); 4. Propõe-se a utilização de I ou log I para predizer a atividade amilolítica de fungos em meio líquido, como método rápido de triagem de fungos amilolíticos e seus mutantes.

Referências Bibliográficas

1. Bernfeld, P. - Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv. Enzymol.* Rel. Subj. Biochem. (New York), 12:379-428, 1951.
2. Ceska, M.; Birath, K. & Brown, B. - A new and rapid method for the clinical determination of α -amylase activities in human serum and urine: optimal conditions. *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)*, 26:437-453, 1969.
3. Ceska, M. - Enzymic catalysis of solidified media. *Eur. J. Biochem. (Berlin)*, 22:186-192, 1971.
4. Dhawale, M.R.; Wilson, J.J.; Khachatourians, G.G. & Ingledew, W.M. - Improved method for detection of starch hydrolysis. *Appl. Environ. Microbiol. (Washington)*, 44:747-750, 1982.
5. Ficicchia, F. & Floris, E. - Determinazione enzimatiche su piaste di agar. *Farmaco-Ed. Prat. (Pavia)*, 35:329-338, 1980.
6. Miller, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem. (Washington)*, 31:426-428, 1959.
7. Schil Wolf, F. & Schumacher, G.F.B. - Radial diffusion in gel for microdetermination of enzymes. *Anal. Biochem. (New York)*, 46:502-533, 1972.

ESTUDO DA NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE SUBSTÂNCIAS QUE ABSORVEM NO ULTRAVIOLETA POR *ASPERGILLUS OCHRACEUS*

Alírio de Carvalho
 Regina Celi Rosim
 & Rubens Molinari

Deptº de Química Tecnológica e de Aplicação
 Instituto de Química UNESP
 Caixa Postal 174
 14800 Araraquara SP, Brasil

Resumo

Foram estudadas as necessidades nutricionais para o crescimento microbiano e a produção de substâncias que absorvem no ultravioleta (S_{260}) pelo *A. ochraceus* em meios de cultura quimicamente definidos. Constatou-se que o crescimento do microrganismo e o acúmulo do material S_{260} são processos simultâneos em todas as fases do desenvolvimento do bolor. Verificou-se que, usando-se maltose como fonte de carbono, várias substâncias servem como fonte de nitrogênio para o crescimento microbiano e produção do material S_{260} , destacando-se, entre as estudadas, o sulfato de amônio em mistura com carbonato de cálcio, o L-aspartato de potássio, o nitrato de potássio, a glicina, a ureia, a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio e a gelatina. Observou-se ainda que a concentração inicial de fósforo é fundamental para a produção do material que absorve no UV e que as concentrações iniciais ótimas para maior produção e para maior crescimento do *A. ochraceus* são diferentes sendo, respectivamente, 0,5mM e 0,3mM. A produção máxima destas substâncias foi obtida em meio contendo, por litro, 50g de maltose, 4g (30mM) de $(NH_4)_2SO_4$, 4g de $CaCO_3$, 0,087g (0,5mM) de K_2HPO_4 , 1,568g (9mM) de K_2SO_4 e 0,2g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Neste meio o crescimento e a produção máximos são obtidos após 264 horas de agitação.

Summary

Production of UV light absorbing substances by Aspergillus ochraceus in relation to media composition

Chemically defined media, suitable for *A. ochraceus* growth and UV light absorbing substances accumulation, were developed. Growth and material production were found to be simultaneous in all growth phases. Several assimilable nitrogenous sources can sustain both growth and production. Ammonium sulfate buffered with a calcium carbonate, potassium L-aspartate, potassium nitrate, glycine, urea, ammonium sulfate plus potassium L-aspartate and gelatin were among those studied and are the best for both activities, when maltose was used as a carbon source. Phosphate concentration is the most important variable controlling the secretion of the substances that absorb UV light, and phosphate concentration for the maximum accumulation is different from the concentration for maximum growth: 0,5mM and 3,0mM, respectively. Maximum production was obtained in a medium containing (per liter)

50g of maltose, 4g (30mM) of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4g of CaCO_3 , 0,087g (0,5mM) of K_2HPO_4 , 1,568g (9mM) of K_2SO_4 and 0,2g of $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. In this medium growth and accumulation maxima occurred after 264 hours of agitation.

Introdução

A produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por fermentação microbiana tem sido bastante estudada (8, 9, 10, 11, 12, 14, 16). Estudamos o assunto já há alguns anos, tendo trabalhado tanto com bactérias (2, 3) quanto com bolores (4, 6).

O objetivo do presente trabalho foi estender, pelo emprego de meios de cultivo quimicamente definidos, este estudo ao *Aspergillus ochraceus*, tendo em vista a obtenção de conhecimentos que possibilitem, no futuro, uma melhor compreensão da fisiologia deste bolor.

Material e Métodos

Meio para preparação do inóculo - A composição deste meio era, por litro, a seguinte: 15g de sacarose; 1,98g (15mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 1,306g (7,5mM) de K_2HPO_4 ; 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 10mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 5mg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20g de ágar para a solidificação do meio.

Inóculo - Foi preparada uma suspensão de esporos de cultura do *Aspergillus ochraceus* pela adição de 8ml de água destilada esterilizada a três tubos da cultura na forma de ágar inclinado. A suspensão de esporos foi obtida raspando-se suavemente a superfície do meio com uma espátula esterilizada.

A seguir foram inoculados 10 frascos de Roux, contendo 200ml do meio já indicado, com 2ml da suspensão de esporos, esparramando-se uniformemente o inóculo sobre o meio sólido e os frascos foram deixados à temperatura ambiente durante 30 dias.

Foram adicionados, então, 130ml de água destilada esterilizada a cada frasco e a suspensão de esporos foi preparada da forma já descrita. A suspensão obtida foi assepticamente homogeneizada em liquidificador de copo de alumínio, estéril, e transferida, em porções de 10 a 30ml, para frascos estéreis de 50ml. Após serem fechados com tampa de borracha e proteção de alumínio, os frascos foram mantidos à temperatura ambiente até serem usados.

Meio básico - A composição do meio básico empregado no estudo das fontes de nitrogênio foi, por litro, a seguinte: 3,96g (30mM) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,306g (7,5mM) de K_2HPO_4 e 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Esterilização dos meios de cultivo e outros materiais - A esterilização foi feita por aquecimento, em autoclave, mantendo-se o aquecimento efetivo a 121°C durante 20 minutos. A fonte de carbono era esterilizada à parte e depois acrescentada assepticamente ao restante do meio.

O pH dos meios era ajustado, após a esterilização, quando necessário, pela adição de ácido sulfúrico ou hidróxido de potássio diluídos e esterilizados, de modo a obter-se pH entre 6,5 e 7,0.

Técnicas de fermentação - O processo empregado para permitir o crescimento do microrganismo em condições de produzir as substâncias que absorvem no ultravioleta (S₂₆₀) foi o de "frascos agitados". Com tal técnica a atividade microbiana ocorreu em cultura submersa, em frascos de Erlenmeyer submetidos à rotação. Foram utilizados frascos de 125ml, contendo 30ml de meio nutriente e 1,0ml de inóculo, colocados na mesa agitadora, onde descreviam círculos de aproximadamente 3cm de diâmetro na velocidade de 250 rotações por minuto.

Os frascos foram tampados com espuma de poliuretano de 1cm de espessura, presa à boca do frasco por elástico. O crescimento foi feito em estufa mantida a 30°C, em

experimentos de 170 horas, em que a agitação só era interrompida o mínimo possível, para carga e descarga do aparelho, a fim de manter oxigenação contínua ao microrganismo em desenvolvimento.

As experiências foram sempre constituídas por duplicatas, ou seja, cada resultado deriva de par de frascos preparados e analisados paralelamente.

Métodos analíticos - A produção das substâncias S₂₆₀ foi determinada pela absorbância (A₂₆₀), medida a 260nm, do caldo de fermentado filtrado. Foram feitas correções nos valores obtidos em função da absorbância do meio nutriente esterilizado ("Branco") e do volume final do caldo fermentado em relação ao volume inicial de meio de cultivo. Tais correções são necessárias para permitir a correta comparação de resultados dentro de uma mesma experiência e entre experiências diferentes, visto ser normal a perda de água no processo de fermentação. Determinava-se também o pH do filtrado.

Por analogia com o sistema utilizado por Bendich (1), definiu-se uma unidade de material S₂₆₀ como a quantidade de substâncias contida em 1ml de solução, cuja absorbância a 260nm é 1,0 medida em cuba de 1cm.

O crescimento microbiano foi avaliado pela determinação da massa micelar do microrganismo filtrado e lavado com água destilada. O micélio lavado era transferido, com auxílio de um mínimo de água, para copos de 50ml previamente secos e pesados. Elimina-se a maior parte da água de transferência por aquecimento dos copos em chapa quente (não se permitindo ebulição), seguindo-se aquecimento em estufa a 105°C durante 15 horas.

Os resultados, média dos pares, são apresentados como micélio por mililitro de caldo fermentado (mg/ml), referidos ao volume inicial de meio e desprezando-se a contribuição do inóculo.

Quando o meio de cultura continha carbonato de cálcio, o micélio era lavado com ácido perclórico 0,1M antes de ser lavado com água para a remoção daquele sólido.

Resultados

Fonte de nitrogênio - Os resultados obtidos pela substituição do sulfato de amônio, no meio básico, por várias outras fontes de nitrogênio, usando-se maltose como fonte de carbono (7), estão indicados na Tabela 1. Pode ser observado que destacadamente a melhor fonte de nitrogênio, entre as estudadas para a produção das substâncias S₂₆₀, é o sulfato de amônio em mistura com carbonato de cálcio, vindo a seguir o L-aspartato de potássio, o nitrato de potássio, a glicina, a uréia e as demais com menor produção.

Para o crescimento do *A. ochraceus* observamos que as melhores fontes de

Tabela 1 - Efeito da fonte de nitrogênio na produção do material S₂₆₀ e no crescimento do *Aspergillus ochraceus*, usando-se maltose como fonte de carbono

Fontes de nitrogênio	pH final (170 horas)	A ₂₆₀ final	Concentração micelar (mg/ml)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30mM) com CaCO ₃ (4g/l)	7,1	17,1	11,0
L-Aspartato de potássio (60mM)	7,5	8,5	6,0
KNO ₃ (60mM)	7,8	8,0	9,6
Glicina (60mM)	5,1	6,6	10,9
Uréia (30mM)	6,3	5,9	14,0
(NH ₄) ₂ SO ₄ (15mM) com L-Aspartato de potássio (30mM)	6,0	5,7	19,6
Glutamina (5g/l)	5,6	5,2	10,8
(NH ₄) ₂ SO ₄ (30mM)	2,8	4,1	3,9
Triptanolamina (60mM)	8,1	3,4	0,8
Nenhuma	7,4	0,8	0,1

nitrogênio, entre as estudadas, são a mistura de sulfato de amônio com L-aspartato de potássio, a uréia, o sulfato de amônio em mistura com carbonato de cálcio, a glicina, a gelatina e as demais com menor crescimento.

Observa-se ainda na Tabela 1 que a adição de carbonato de cálcio promove aumento de 317% na produção do material S₂₆₀ e de 182% no crescimento do *A. ochraceus*, quando se usa sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, e que, pela adição de L-aspartato de potássio, houve aumento de 39% na produção do material e de 403% no crescimento microbiano.

Concentração da fonte de fósforo

Ao se estudar a influência da concentração do ortofosfato dipotássico na produção do material S₂₆₀ e crescimento microbiano em meio contendo maltose (50g/l) como fonte de carbono e energia e o sulfato de amônio (30mM), tamponado com carbonato de cálcio (4g/l), como fonte de nitrogênio, obtiveram-se os resultados indicados na Tabela 4. A concentração de potássio foi mantida constante pela adição de sulfato de potássio.

Os resultados mostram que a concentração inicial de fósforo é fundamental para a produção das substâncias em estudo, pois o acúmulo do material aumenta ao se reduzir a concentração inicial da fonte de fósforo e é maior na vizinhança de 0,5mM, enquanto o maior crescimento do *A. ochraceus* ocorre na presença de 3,0mM de ortofosfato.

Comparando-se os resultados das Tabelas 1 e 2 observamos que, para a mesma concentração inicial de ortofosfato (7,5mM), tem-se, em 170 horas, aumento de 42% na produção do material, aumento de 62% no crescimento do *A. ochraceus* e redução de 38% no pH final ao aumentar-se a concentração inicial de potássio de 15meq g/l para 20meq g/l, o que indicava a necessidade de estudo da melhor concentração deste cátion.

Influência da concentração de potássio - A Tabela 3 contém os resultados obtidos ao se estudar a influência da concentração inicial de potássio na produção das substâncias S₂₆₀ e crescimento do bolor em meio contendo, entre outros nutrientes já indicados, o ortofosfato dipotássico na concentração 0,5mM.

Os resultados obtidos mostram que, entre as concentrações de potássio usadas, ocorreu aumento no crescimento microbiano e na produção das substâncias S₂₆₀ até a concentração de potássio correspondente a 19meq g/l.

Esta Tabela mostra ainda que, quando se substitui o ortofosfato dipotássico pelo sal dissódico, ocorreu aumento de 40% na produção do material S₂₆₀, contudo sem grande variação (7,6%) no crescimento microbiano. Embora não tenha sido estudada a influência da concentração de sódio, provavelmente poder-se-ia aumentar a produção do material S₂₆₀ pela adição deste elemento ao meio utilizado.

Tabela 2 - Influência da concentração da fonte de fósforo na produção das substâncias S₂₆₀ e no crescimento do *Aspergillus ochraceus*

K ₂ HPO ₄ (mM)	K ₂ SO ₄ (mM)	pH final	A ₂₆₀ final	Concentração micelar (mg/ml)	A	
					Concentração micelar	
0,0	10,0	7,1	11,6	1,6		7,3
0,5	9,5	5,2	30,4	13,3		2,3
1,5	8,5	5,1	28,4	18,5		1,5
3,0	7,0	5,3	28,4	21,5		1,3
4,5	5,5	3,7	27,6	19,0		1,5
6,0	4,0	3,7	26,4	18,2		1,5
7,5	2,5	4,4	24,2	17,8		1,4
9,0	1,0	4,3	21,2	18,0		1,2
10,0	0,0	4,9	20,0	17,0		1,2

Tabela 3 - Influência da concentração de potássio na produção do material S₂₆₀ e no crescimento do *Aspergillus ochraceus*.

Símbolos: * = Neste meio o ortofosfato dipotássico (0,5mM) foi substituído pelo sal dissódico de mesma concentração

K ₂ SO ₄ (mM)	Potássio (meq g/l)	pH final	A ₂₆₀ final	Concentração micelar (mg/ml)
0,0	0,0*	5,2	21,0	5,7
0,0	1,0	6,4	15,0	5,3
1,5	4,0	6,4	16,2	6,4
3,0	7,0	5,6	17,4	7,6
4,5	10,0	5,5	18,6	8,7
6,0	13,0	4,1	21,2	11,0
7,5	16,0	6,6	24,6	12,4
9,0	19,0	4,7	29,4	13,0
10,5	22,0	4,7	29,4	9,9

Tabela 4 - Influência do volume inicial de meio nutriente na produção do material S₂₆₀ e no crescimento do *Aspergillus ochraceus*. Inóculo: todos os frascos receberam 1ml da suspensão de esporos da espécie utilizada

Volume de meio (ml)	pH final	A ₂₆₀ final	Concentração micelar (mg/ml)
10,0	5,3	8,9	12,0
15,0	4,5	17,1	11,8
20,0	5,0	20,5	12,8
25,0	5,2	28,0	14,6
30,0	4,7	30,0	11,9
35,0	4,8	38,2	11,1
40,0	4,8	36,2	10,4
45,0	4,1	36,8	10,1
50,0	4,9	36,1	9,9
55,0	5,2	24,6	9,8

Tabela 5 - Influência do volume de inóculo na produção das substâncias S₂₆₀ e no crescimento do *Aspergillus ochraceus*. Todos os frascos continham 35ml de meio nutriente. Tempo de agitação: 264 horas

Volume de inóculo (ml)	pH final	A ₂₆₀ final	Concentração micelar (mg/ml)
0,2	4,8	33,5	12,3
0,4	4,7	39,8	15,6
0,6	4,7	47,5	17,2
0,8	4,6	50,2	19,7
1,0	4,4	53,9	21,3
1,2	4,3	54,4	23,0
1,4	4,1	53,0	23,9
1,6	4,2	50,2	23,0
1,8	4,6	44,7	18,2
2,0	4,9	36,3	11,5

Influência do volume de meio - A Tabela 4 mostra os resultados obtidos ao se estudar a influência do volume de meio por frasco, usando-se o meio desenvolvido, ou seja, que contém por litro: 50g de maltose, 3,96g (30mM) de (NH₄)₂SO₄; 4g de CaCO₃; 87mg (0,5mM) de K₂HPO₄; 1,568g (9mM) de K₂SO₄ e 0,2g de MgSO₄·7H₂O.

Os resultados mostram que, entre os volumes de meio utilizados, obtém-se maior crescimento microbiano e maior produção do material S₂₆₀ com 25ml e 35ml, respectivamente.

A Figura 1 mostra as curvas de produção das substâncias S₂₆₀ e crescimento do *A. ochraceus* no meio desenvolvido, em função do tempo de agitação, e usando-se 35ml de meio nutriente por frasco. Os resultados indicam que o crescimento máximo do microrganismo e a produção máxima do material foram obtidos com 264 horas de agitação, com aumento de 100% no crescimento e de 39% na produção, quando comparados com os valores obtidos em experiências de 170 horas de agitação.

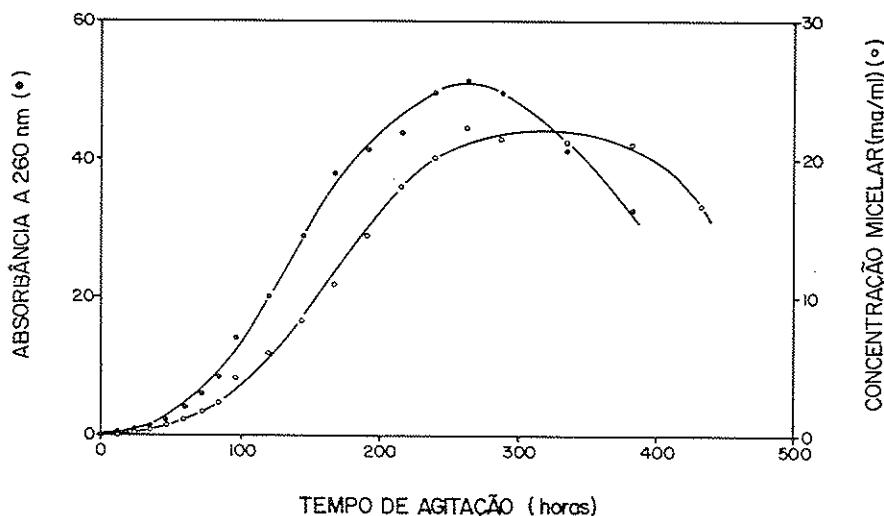
Influência do volume de inóculo - Ao se estudar a influência do volume de inóculo os resultados obtidos Tabela 5 indicaram que, entre os valores utilizados, e com 264 horas de agitação, tem-se maior produção das substâncias S₂₆₀ e maior crescimento do *A. ochraceus* com 1,2ml e 1,4ml, respectivamente.

Discussão

A Tabela 1 contém resultados que indicam que, ao se usar maltose como fonte de carbono, várias substâncias servem como fonte de nitrogênio destacando-se entre elas o sulfato de amônio em mistura com carbonato de cálcio, o L-aspartato de potássio, o nitrato de potássio, a glicina, a úreia e outras com menor produção. Pode-se, ainda, observar nesta Tabela que o pH final do caldo fermentado depende da fonte de nitrogênio usada pelo *A. ochraceus*. Quando é utilizada o sulfato de amônio, o pH final diminui em virtude da incorporação do íon amônio em substâncias neutras com consequente diminuição da produção das substâncias S₂₆₀ e do crescimento do bolor. Entretanto com o uso das misturas do sulfato de amônio com carbonato de cálcio ou com L-aspartato de potássio foi possível evitar-se grandes variações do pH e obtivemos aumento superior a 300% na produção e superior a 400% no crescimento microbiano. Esta possibilidade já havia sido observada anteriormente em bactérias (2) e em bolores (4, 6).

Em relação à influência de fosfato (Tabela 2), os resultados obtidos mostram que, ao aumentar-se a concentração inicial de ortofosfato, diminui progressivamente a produção específica, razão entre a A₂₆₀ e a concentração micelar, indicando maior

Figura 1 - Curvas de crescimento do *Aspergillus ochraceus* e produção das substâncias S260, em função do tempo de agitação, no meio nutritivo desenvolvido



crescimento do *A. ochraceus* e, relativamente, menor produção do material S260. Isto significa que, em meios contendo baixas concentrações de ortofosfato, o microrganismo secreta para o meio de cultura precursores de ácidos nucleicos em virtude da falta de fosfato para a produção de nucleosídeos trifosfatos necessários à síntese destas macromoléculas. O mesmo já havia sido observado anteriormente para o *Streptomyces aureofaciens* (2), para o *Aspergillus niger* (4) e para o *Aspergillus amstelodami* (6).

Os resultados da Tabela 2 mostram que a concentração inicial ótima de fosfato para a produção das substâncias S260 não coincide com a concentração inicial ótima para o crescimento e que, entre as concentrações usadas, a maior produção foi obtida na presença de 0,5mM de ortofosfato, enquanto o maior crescimento do *A. ochraceus* ocorreu na presença de 3,0mM deste sal.

Os resultados da Tabela 3 mostram a necessidade de suplementação do potássio introduzido com o fosfato, pela adição de sulfato de potássio até concentração total da ordem de 19meq g/l, para obter-se maior crescimento do *A. ochraceus* e maior produção das substâncias em estudo.

Esta Tabela mostra ainda que, ao se substituir o ortofosfato dipotássico pelo sal dissódico, ocorreu aumento de 40% na produção do material S260, sem grande variação (7,6%) no crescimento microbiano. Embora não tenha sido estudada a influência da concentração de sódio, poder-se-ia, muito provavelmente, aumentar a produção das S260 pela adição deste elemento químico ao meio desenvolvido. Este estímulo já havia sido observado anteriormente com o *Aspergillus amstelodami* (6), mas não com o *Streptomyces aureofaciens* (2) ou com o *Aspergillus niger* (4).

Os resultados das Tabelas 4 e 5 mostram que os volumes de meio e de inóculo são variáveis interdependentes e que a produção do material S260 dependia da relação entre estes volumes e era máxima, nas condições e relações usadas, para 35ml de meio nutritivo e 1,2ml de inóculo de *A. ochraceus*. O decréscimo da produção para volumes de meio acima do volume ótimo indica a dependência do processo à aeração, que é função, neste caso, do volume de líquido no frasco.

Confirmando resultados anteriores, obtidos com o *Streptomyces aureofaciens* (2), com o *Aspergillus niger* (4) e com o *Aspergillus amstelodami* (6), a Figura 1 mostra que o crescimento do *A. ochraceus* e o acúmulo das substâncias S260 no caldo fermentado são também processos simultâneos em todas as fases do desenvolvimento

deste bolor. Isto implica novamente em que a produção do material está diretamente relacionada à atividade microbiana, não se tratando de processo de degradação de ácidos nucleicos na fase decrescente (13, 17). O fato de a produção das substâncias S₂₆₀ ser processo aeróbio pode ser visto também como outra indicação contrária à hipótese de hidrólise de ácidos nucleicos, processo este que não depende de oxigênio, e, sim, de desvio metabólico ativo que pode ser nutricionalmente manipulado.

A análise do caldo fermentado, através de cromatografia de troca-iônica, chromatografia em papel e espectrofotometria ultravioleta, indica, de maneira semelhante ao trabalho com *Streptomyces aureofaciens* (8), a presença de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos, como será visto em publicação posterior.

Referências Bibliográficas

1. Bendich, A. - Methods for characterization of nucleic acids by base composition. In: - Colowick, S.P. & Kaplan, N.O. - Methods in enzymology. New York, Academic Press, vol. III, p.715-723, 1957.
2. Carvalho, A. & Molinari, R. - Production of nucleic acid-related substances by *Streptomyces aureofaciens*. Rev. Bras. Tecnol., 7:289-296, 1976.
3. Carvalho, A.; Oliveira, P.L.C. & Molinari, R. - Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Streptomyces aureofaciens* em meios complexos. Ecl. Quím., 2:47-60, 1977.
4. Carvalho, A.; Faria, C.R. & Molinari, R. - Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios quimicamente definidos. Ecl. Quím., 3:55-67, 1978.
5. Carvalho, A.; Sita, W. & Molinari, R. - Produção de substâncias relacionadas a ácidos nucleicos por *Aspergillus niger* em meios complexos. Ecl. Quím., 5:63-70, 1980.
6. Carvalho, A.; Rebolla, E.A. & Molinari, R. - Estudo da nutrição e produção de substâncias que absorvem no UV por fermentação com *Aspergillus amstelodami*. Ecl. Quím., 6:21-28, 1981.
7. Carvalho, A. - Produção de substâncias, que absorvem no ultravioleta, por fermentação microbiana: estudos da nutrição e condições de cultivo para produção máxima. Araraquara, Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", UNESP, 1982. (Tese de Livre-Docência).
8. Carvalho, A. & Molinari, R. - Identification of low-molecular-weight nucleic acid-related substances secreted by *Streptomyces aureofaciens*. Appl. Environ. Microbiol., 46:762-764, 1983.
9. Chernenskii, D.N. - Nucleotides of the culture liquid filtrate of the fungus *Penicillium siccova*. Prikl. Biokhim. Mikrobiol. (U.R.S.S.), 9:236-239, 1973.
10. Demain, A.L.; Jackson, M.; Vitali, R.A.; Hendlin, D. & Jacob, T.A. - Production of guanosine 5'-monophosphate and inosine 5'- monophosphate by fermentation. Appl. Microbiol., 14:821-825, 1966.
11. Furuya, A. - Annual review of fermentation technology, Japan, 1973: nucleic acids and related substances. Hakkō Kogaku Zasshi (Japan), 52:461-467, 1974.
12. Hara, T. & Ueda, S. - Studies on nucleic acid production and application. II - A further study of extracellular DNA production by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Appl. Biochem., 3:11-18, 1981.
13. Herbst, E.J. & Doctor, B.P. - Inhibition of ribonucleic acid degradation in bacteria by spermine. J. Biol. Chem., 234:1497-1500, 1959.
14. Igarashi, S.; Takeuchi, Y.; Imada, A. & Nogami, I. - Accumulation of adenosine nucleotides by *Streptomyces*. Takeda Kenkyusho Nempo (Japan), 23:64-68, 1964.
15. Kotani, Y.; Yamaguchi, K.; Kato, F. & Furuya, A. - Production of nucleic acid-related substances by fermentative processes: inosine accumulation by mutants of *Brevibacterium ammoniagenes*, strain improvement and culture conditions. Agric. Biol. Chem., 42:399-405, 1978.
16. Schwartz, J. & Margalith, P. - Binding of end product in the fermentation of nucleotides. Biotechnol. Bioeng., 15:85-91, 1973.
17. Simuth, J. & Zelinka, J. - Nucleic acid degradation products of *Streptomyces aureofaciens*. J. Antibiot., 23:242-249, 1970.

OCORRÊNCIA DA GALACTOSE OXIDASE EM *FUSARIUM GRAMINEARUM*

Deise Dias
 & Carlos Kammelmeier

Laboratório de Química e Fisiologia de Microrganismos
 Deptº de Farmácia e Bioquímica
 Universidade Estadual de Maringá
 Caixa Postal 331
 87100 Maringá PR, Brasil

Resumo

A atividade da enzima galactose oxidase foi testada em 48 amostras de *Fusarium graminearum* isoladas na Região Sul do Brasil. Das amostras testadas, 37,5% demonstraram atividade de galactose oxidase, indicando que a presença desta enzima pode ser muito frequente em amostras de *Fusarium graminearum*.

Summary

Galactose oxidase occurrence in Fusarium graminearum

Galactose oxidase activity was tested in 48 *Fusarium graminearum* strains isolated from the South region of Brazil. 37.5% of the strains gave galactose oxidase activity, showing that this enzyme can be widely distributed in *Fusarium graminearum* strains.

Introdução

A galactose oxidase (EC 1.1.3.9) é uma enzima empregada para a determinação quantitativa da D-galactose (2). Estudos relativos ao seu isolamento, caracterização e produção, tem sido desenvolvidos com um fungo produtor de galactose oxidase sob as denominações de *Polyporus circinatus* e *Dactylium dendroides* (2, 3, 4, 12). Entretanto, a controvérsia existente na literatura com relação à sua identificação taxionómica (7, 8, 9, 10), tem conduzido a trilhagens com diferentes microrganismos para verificar a distribuição desta enzima. Assim, Ganoedo & col. (6), demonstraram sua presença principalmente em *Fusarium moniliiforme*. Aisaka & Terada (1) em seleção abrangente, com grande número de microrganismos, demonstraram a sua presença em *Gibberella fujikuroi* e também Bugolova & col. (5) em análises com diversas espécies de *Fusarium* demonstraram a presença de galactose oxidase em *Fusarium graminearum*. É importante salientar que nos principais estudos descritos, a presença desta enzima tem sido relacionada principalmente com fungos do gênero *Fusarium*. Portanto, nossa intenção ao realizar o presente trabalho, foi verificar a distribuição desta enzima em *Fusarium graminearum*. Desta forma, obtiveram-se 48 amostras isoladas na Região Sul do País as quais foram testadas para a produção de galactose oxidase.

Material e Métodos

Microrganismos - Foram utilizadas 48 amostras de *Fusarium graminearum* (Fg), obtidas em diferentes localidades dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. As amostras foram obtidas das raízes (FgR) e das sementes (FgS) de trigo e milho, por isolamento monospórico e estão sendo mantidas através de repiques

trimestrais em meio PDA (Potato Dextrose Agar).

Meio de cultivo - Foi utilizado o meio líquido descrito por Markus (11) em pH 5,8, contendo glicose a 2%.

Condições de cultivo - As amostras foram repicadas do meio sólido para o meio líquido e submetidas a crescimento por 24 horas (pré-inóculo) em agitador reciprocante, 70 batimentos por minuto a 28°C e ao abrigo da luz. Inóculo de 2% vol/vol de cada amostra foi dispensado em frascos de 125ml contendo 25ml do meio de cultivo. Permitiu-se o crescimento dos fungos, nestas condições, por um período de 60 horas.

Determinação da atividade da galactose oxidase - Aliquotas de 0,5ml do meio de cultivo filtrado foram incubadas por 10 minutos a 30°C com 1,4ml de mistura reativa (5ml de solução tampão fosfato 0,5M, pH 7,2; 5mg de peroxidase e 1ml de solução etanólica a 1g% de ortodianisidina, diluídos em água até volume final de 50ml). O volume do sistema de incubação foi completado para 2,0ml com 0,1ml de galactose em concentração final de $2,5 \times 10^{-2}$ M. O desenvolvimento da reação foi acompanhado espectrofotometricamente em 420nm. Una unidade de atividade enzimática de acordo com Amaral (2) é definida como a quantidade de enzima que proporciona uma mudança de absorção de 1,000 em 10 minutos, nas condições de ensaio.

Resultados e Discussão

De 48 amostras de *Fusarium graminearum* testadas, 18 (37,5%) demonstraram atividade de galactose oxidase em quantidades variáveis (Tabela 1), pequenas porém, se comparadas com a de *Dactylium dendroides* (3). Como o objetivo do trabalho era a detecção da enzima e não a otimização das condições de sua produção, poderíamos supor que a quantidade de enzima e a porcentagem de amostras produtoras encontradas, poderiam ser maiores se algumas condições empregadas fossem modificadas, como por exemplo: a substituição da agitação reciprocante (70 batimentos por minuto) por agitação oscilatória (120-200rpm) e também o tempo de crescimento de 60 horas poderia ser aumentado para 96 horas, onde em geral ocorre maior atividade da enzima (2). Ainda assim, para efeito comparativo, o peso seco dos micélios (Tabela 1), demonstra que nas condições empregadas as amostras apresentavam um crescimento razoavelmente uniforme.

Tabela 1 - Atividade da galactose oxidase em *Fusarium graminearum*

<i>F. graminearum</i> identificação	Micélios (peso seco) mg/ml meio	Atividade de galactose oxidase Unidades enzima/ml meio
IAPAR Fg 6145	5,8	0,43
IAPAR Fg 6263	5,6	0,10
CNPBrigo FgR 07	5,6	0,10
FgR 08	5,6	0,08
FgR 10	5,5	0,06
FgR 11	5,5	0,08
FgR 14	5,7	0,14
FgR 15	5,2	0,10
FgR 17	6,0	0,06
FgR 19	4,4	0,08
FgK 20	5,3	0,07
Fg 21	5,7	0,12
Fg 25	5,6	0,10
Fg 28	6,6	0,08
FgS 05	5,4	0,06
FgS 12	5,9	0,08
FgS 13	5,2	0,07
FgS 14	5,6	0,08

A detecção de galactose oxidase associada a *Fusarium* (1, 5, 6) e a porcentagem de amostras com atividade da enzima aqui encontrada, sugerem uma distribuição mais frequente desta enzima para *Fusarium graminearum*, principalmente se considerarmos a Região Sul do País, de onde foram obtidas as amostras testadas, bem como também, de onde foi originalmente isolada a amostra produtora de galactose oxidase denominada de *Dactylium dendroides*.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Erlei M. Reis do CNPTrigo (RS), ao IAPAR, pelas amostras de *Fusarium graminearum* e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências Bibliográficas

1. Aisaka, K. & Terada, O. - Production of galactose oxidase by *Gibberella fujikuroi*. *Agric. Biol. Chem.*, 45:2311-2316, 1981.
2. Amaral, D.; Falcoz-Kelly, F. & Horecker, B.L. - Galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. In: - Wood, W.A., ed. - *Methods in enzymology*. New York, Academic Press, vol. IX, p.87-92, 1966.
3. Avigad, G.; Amaral, D.; Asensio, C. & Horecker, B.L. - The D-galactose oxidase of *Polyporus circinatus*. *J. Biol. Chem.*, 237:2736-2743, 1962.
4. Cooper, J.A.D.; Smith, W.; Bacila, M. & Medina, H. - Galactose oxidase from *Polyporus circinatus*. *J. Biol. Chem.*, 234:445-448, 1958.
5. Bugolova, T.T.; Kirilenko, T.S.; Zakharova, Y.I. & Yunitskaya, V.A. - Description of *Fusarium graminearum* IMV-F 1060 a producer of galactose oxidase. *Mikol. Fitopatol.*, 16:503-508, 1982.
6. Gancedo, J.M.; Gancedo, C. & Asensio, C. - Widespread occurrence of galactose oxidase and glucose oxidase in fungi. *Arch. Biochem. Biophysics*, 119:588-590, 1967.
7. Kermelmeier, C. & Zancan, G.T. - Studies on the taxonomy of a mold producing galactose oxidase. *Arq. Biol. Tecnol.*, 21:75-85, 1978.
8. Kermelmeier, C. & Zancan, G.T. - Chemical and immunological properties of galactoglucomannans from *Dactylium dendroides*. *Experimental Mycology*, 5:339-348, 1981.
9. Kermelmeier, C. & Zancan, G.T. - Serological differentiation of the galactose oxidase producer mold from *Dactylium dendroides*. *Arq. Biol. Tecnol.*, 26:403-407, 1983.
10. Nobles, M.K. & Madhosingh, C. - *Dactylium dendroides* (Bull) Fr. misnamed as *Polyporus circinatus* Fr. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 12:146-147, 1963.
11. Markus, Z.; Miller, G. & Avigad, G. - Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. *Appl. Microbiol.*, 13:686-693, 1965.
12. Shatzman, A.R. & Kosman, D.J. - Regulation of galactose oxidase synthesis and secretion in *Dactylium dendroides*: effects of pH and culture density. *J. Bacteriol.*, 130:455-463, 1977.

OCORRÊNCIA DE CAMPYLOBACTER FETUS SUBESPÉCIE JEJUNI EM CARCAÇAS DE FRANGOS E SUÍNOS*

Paulo Fernando de Almeida

Deptº das Ciências da Bioagressão
Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia
40000 Salvador BA

& Antonio de Melo Serrano

Faculdade de Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
13081 Campinas SP

Resumo

Em 1981, foram analisadas 40 carcaças de frangos e 40 carcaças de suínos, coletadas na linha final de abate, em matadouros no Estado de São Paulo. Cada amostra de carcaça foi obtida passando-se uma zaragatoa umedecida em água peptonada sobre 3 áreas pré-determinadas. Aliquotas foram espalhadas em ágar seletivo para *Campylobacter*. A incubação foi feita a 42°C em microaerofilia, por 72 horas. Dez por cento das colônias típicas foram verificadas quanto à morfologia e motilidade. A confirmação foi feita por testes bioquímicos e de tolerância. O *C. fetus* subsp. *jejuni* foi confirmado em 47,5% das amostras de frangos e em 35,0% das de suínos. O organismo foi detectado em níveis de 0,06 a $4,7 \times 10^2$ células variáveis/cm² de superfície analisada.

Summary

Occurrence of Campylobacter fetus subsp. jejuni in pig and poultry carcasses

In 1981, fourty samples of chicken carcasses and fourty samples of swine carcasses collected after the final rinsing from slaughterhouses in São Paulo state were examined. Each carcass sample was obtained by passing swabs wetted in peptone water over three predetermined areas. Aliquots were spread on plates of selective agar for *Campylobacter*. The plates were incubated at 42°C in a microaerophyllic atmosphere for 72 hours. Ten percent of the typical colonies were examined with respect to their morphology and motility. *C. fetus* subsp. *jejuni* was confirmed in 47,5% of the chicken samples and 35,0% of the swine samples. The organism was detected at levels of 0,06 to $4,7 \times 10^2$ viable cells per cm² of surface examined.

Introdução

Muito embora as espécies do gênero *Campylobacter* já tivessem sido reconhecidas

*Resumo da Tese de Mestrado apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP pelo 1º autor e orientada pelo 2º autor.

como agentes responsáveis por várias doenças animais, somente recentemente é que o *C. fetus* subespécie *jejuni* (campilobacter termotolerante) vem sendo incriminado por grande parte dos casos de gastroenterites em seres humanos de diversos países. No Brasil, a doença foi diagnosticada em crianças nos estados do Rio de Janeiro (12), Pernambuco (9) e São Paulo (4).

De acordo com King (7), o estudo das infecções humanas ocasionadas por campilobactérios não deve ficar restrito a esta espécie, devido a ampla distribuição desses organismos entre os animais, seja em estado patogênico ou comensal.

Em decorrência do frequente isolamento dos campilobactérios termotolerantes, principalmente *C. jejuni*, da flora intestinal de animais de abate, em números relativamente elevados, bem como pela suspeita destes animais serem responsáveis pela transmissão do microrganismo ao homem, vários pesquisadores se empenham na pesquisa desses microrganismos em carcaças e vísceras comestíveis de origem animal, devido à possibilidade da ocorrência de contaminação destes com material fecal durante as operações de abate (16).

O *C. jejuni* tem sido isolado de fezes e carcaças de animais tais como bovinos, ovinos e suínos (16), frangos (10) e perus (8), bem como de miúdos comestíveis dessas aves (2), de carne moída bovina (18).

Embora na maioria dos casos de campilobacteriose humana a fonte do microrganismo não tenha sido identificada, existem evidências circunstanciais que os alimentos, particularmente de origem animal, estão implicados na transmissão do *C. jejuni* a indivíduos suscetíveis. Neste sentido, já existem relatos considerando esta doença uma toxinfecção alimentar associada com a ingestão de leite cru, hambúrguer, frangos mal cozidos, produtos alimentícios contendo carne de porco e ostras cruas.

No Brasil são poucos os relatos a respeito da presença de campilobactérios em alimentos. Desta forma este trabalho teve por objetivo avaliar a ocorrência desses organismos em carcaças de frangos e suínos, bem como caracterizar e diferenciar as cepas isoladas.

Material e Métodos

Em 1981 foram examinadas 80 amostras de carcaças frescas evisceradas, provenientes de matadouros sob inspeção federal, sendo 40 de frangos de 55 a 60 dias, abatidos num matadouro em Paulínia e 40 de suínos com cerca de 8 meses, de dois matadouros em Piracicaba e Vinhedo.

Dos frangos, as amostras foram retiradas sobre a pele, das regiões peitoral, ventral e dorsal, imediatamente antes da embalagem. Dos suínos, as amostras foram retiradas das meias-carcaças, após a lavagem final, nas regiões de músculos do pescoço, na parede abdominal interna próximo à última costela e à rafe, e nos músculos adutores da coxa, por onde a serra os dividiu.

Cada amostra de material foi obtida com auxílio de zaragatoas sobre uma superfície de 15cm², nas regiões mencionadas, sendo portanto, de 45cm² a área total analisada. O material era colocado em água peptonada a 0,1% e transportado ao laboratório, sob refrigeração, onde era semeado dentro de três horas após a colheita. Aliquotas de diluições decimais foram espalhadas em ágar nutritivo-hematina (25) seletivo (2) para *Campylobacter*. A incubação foi feita pelo menos durante 72 horas, a 42°C, em jarras para anaerobiose, fazendo-se um vácuo de 500mm de Hg e injetando-se, posteriormente, uma mistura de gases constituída de 90% de nitrogênio e 10% de anidrido carbônico (6). Dez por cento das colônias típicas foram verificadas quanto a morfologia e motilidade em microscopia de contraste de fase e coloração de Gram. As culturas foram confirmadas por testes culturais (15), bioquímico-fisiológicos (6, 7, 8, 19).

Resultados e Discussão

1. Identificação dos organismos isolados - As características morfológicas, culturais, bioquímicas, fisiológicas e de sensibilidade dos campilobactérios isolados das carcaças de frangos e suínos correspondem às aquelas descritas para o *C.*

Tabela 1 - Contagens (por cm²) de *C. fetus* ssp. *jejuni* em carcaças de frangos

Amostras	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F22	F23	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F30	F35	F37	F38	F40
Contagem	4,0	6,3	4,6	8,0	11,0	17,0	0,6	1,3	1,6	2,6	3,7	2,2	2,6	4,4	1,6	3,7	2,4	5,4	1,1
x 10																			

fetus subespécie *jejuni* de Smibert (15).

Dos testes efetuados para diferenciação das cepas isoladas, o teste de sensibilidade a 1,0mg de cloreto de trifénil-tetrazolium por ml de meio foi o que apresentou resultados mais consistentes. Com base neste teste, 95% das cepas isoladas de frangos e 7% das cepas isoladas de suínos assemelham-se ao *C. jejuni*, 21% das isoladas de suínos apresentaram características intermediárias entre o *C. jejuni* e *C. coli*.

2. Exame das carcaças - Foram isoladas 33 cepas de *C. fetus* subespécie *jejuni* de um total de 80 amostras de carcaças de animais de abate.

As carcaças de frangos foram as que apresentaram maior número de amostras positivas, num total de 19 (47,5%) isolamentos, seguida das carcaças de suínos com 14 (35,0%) isolamentos.

De acordo com os dados da Tabela 1 sobre as contagens de *C. fetus* subespécie *jejuni*, em 19 carcaças de frangos, verificamos que a maior densidade encontrada foi de $1,7 \times 10^2$ microrganismos por cm² de superfície analisada.

Os nossos resultados indicam que a ocorrência de *C. fetus* subespécie *jejuni* nas carcaças de frangos é semelhante àquela (45%) relatada por Shanker & col. (13), por cultivo direto sobre placas de Petri, para análise de carcaças de frangos inteiras evisceradas. É bom frisar que o abate desses frangos foi efetuado em operações idênticas às aquelas do nosso estudo.

Verificamos ainda que a ocorrência do microrganismo nas carcaças de frangos, que nós pesquisamos, era inferior àquela relatada por Park & col. (10), no Canadá e EUA, por Bruce & col. (1), na Inglaterra, bem como àquela obtida nos EUA e Nova Zelândia, por Smeltzer (14). Por outro lado, é necessário ressaltar que Park & col. (10) e Smeltzer (14) analisaram carcaças inteiras, empregando procedimento de enriquecimento, filtração em membranas e posterior cultivo em meios seletivos. Entretanto, Park & col. (10), ao empregarem o plaqueamento direto para isolamento do *C. fetus* subespécie *jejuni* das mesmas amostras, obtiveram resultados mais baixos que aqueles encontrados em nossa pesquisa.

A ocorrência de *C. fetus* subespécie *jejuni* em carcaças de frangos situa-se na faixa de 1,8 a 94,0% (3, 14), isto porque as técnicas utilizadas para colheita e tratamento das amostras, bem como a metodologia de isolamento, tem variado amplamente, entre os pesquisadores.

Os valores obtidos nas contagens de *C. fetus* subespécies *jejuni* em carcaças de frangos foram de modo geral baixos, possivelmente porque a técnica de amostragem (5, 11) e os meios empregados para isolamento apresentam limitações, não revelando a contaminação real das amostras.

Analizando a Tabela 2 podemos observar que, do total de 14 casos positivos de isolamento de suínos, o maior número encontrado foi de $4,9 \times 10^2$ *C. fetus* subespécie *jejuni* por cm² de superfície analisada.

Nessas carcaças a ocorrência de contaminação com o *C. fetus* subespécie *jejuni* apresentou percentual semelhante ao encontrado por Stern (17) nos EUA, que utilizou a mesma técnica de amostragem, em área um pouco maior (49,2cm²) que a nossa, sobre o músculo semi-membranoso, nas adjacências do fêmur, porém as carcaças foram analisadas antes da lavagem final, ao contrário do que ocorreu com as nossas análises.

Como a maioria das cepas isoladas de suínos assemelham-se ao *C. coli* e as de frangos ao *C. jejuni*, é provável que as carcaças de frangos possam vir a

ANÁLISE DE METANO POR COMBUSTÃO EM ARCO-VOLTÁICO*

Augusto Ferreira da Eira

Deptº de Defesa Fitossanitária
 Área de Biotecnologia Agrícola
 Faculdade de Ciências Agronômicas 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

A amostra de biogás, após absorção de CO₂ e H₂, em um aparelho de Orsat, é injetada em câmara de combustão sob fluxo constante de O₂ e na presença de arco-voltáico. O CO₂ formado é absorvido em solução de NaOH para subsequente titulometria e cálculo indireto do teor de metano. Um oscilador astável em onda quadrada de 1 KHz, acoplado a um circuito convencional de ignição eletrônica, estabelecem a descarga em arco.

Summary

Methane determination by combustion under electrical discharge

A sample of biogas, after absorption of CO₂ and H₂, on an Orsat apparatus, is injected in a combustion chamber under continuous O₂ flow and action of an electric arc discharge. The CO₂ formed after combustion is absorbed in a NaOH solution for subsequent titrimetry and indirect calculation of the methane content. An astable oscillator which produces square waves of 1 KHz, coupled to a conventional circuit of electronic ignition, establishes an arc discharge.

O método mais preciso para análise qualitativa e quantitativa de biogás, envolve a cromatografia gasosa com detector de condutividade térmica. Entretanto, o mais acessível à maioria das instituições é o método volumétrico de absorção diferencial de gases (método de Orsat), que determina CO₂, H₂ e CH₄, principalmente (Wilson, C.W.; In: - Welcher, F.J., Van Nostrand Reinhold, N.Y., 1963; Vieira, S.M.M. & col. Tecnologia, RJ, 3:26-36, 1981).

Para o caso dos dois primeiros gases, os aparelhos de Orsat nacionais apresentam precisão razoável. Entretanto, para análises de CH₄ em pipeta de combustão (normalmente apropriada para combustão de H₂), os resultados são imprecisos em decorrência, principalmente, de variações nas proporções da mistura carburante, velocidade de admissão da amostra e temperatura de ignição (Salles Filho, S.L.M.,

*Parte da Tese de Mestrado do co-autor; FCA-UNESP, "Campus" de Botucatu SP, abril de 1985.

FCA-UNESP, Botucatu SP, 1985, Tese de Mestrado).

Para viabilizar análises de CH₄, em laboratórios que não dispõem de cromatografia gasosa ou de um aparelho de Orsat de precisão adequada (normalmente importados e de elevado custo), idealizou-se um método de combustão contínua do biogás em arco-voltáico de razoável precisão (Tabela 1) e baixo custo (cerca de Cz\$1.800,00 em abril de 1987).

A amostra do biogás, após absorção do CO₂ e H₂, em aparelho de Orsat, é injetada lentamente em câmara de combustão sob fluxo constante de O₂ (0,3l/min, durante 6 minutos) e na presença de arco-voltáico. O CO₂ formado é absorvido em NaOH para subsequente titulometria e cálculo indireto do teor de metano. Um oscilador astável em onda quadrada e frequência de 1KHz, acoplado a um circuito convencional de ignição eletrônica a descarga capacitiva, estabelecem a descarga em arco para tensões entre 10 e 25KV (Figura 2). Os circuitos não são críticos e empregam componentes de fácil aquisição no mercado e, desta forma, podem ser viabilizados por técnicos em eletrônica de qualquer cidade.

O aparelho (Figura 1) consta de 3 setores básicos: a) amostrador; b) câmara de combustão, oscilador e ignição eletrônica; c) absorção do CO₂. O amostrador é uma seringa de 20ml com êmbolo movido por um pequeno motor de corrente contínua, a uma velocidade constante e controlada. O movimento do êmbolo, para admissão ou expulsão do gás, é comandado por uma chave reversora. Acoplado a este sistema, um ducto de gás liga o amostrador à câmara de combustão.

A câmara de combustão, consiste de um frasco de vidro selado por rolha de borracha, por onde passam 3 tubulações: uma conduz a amostra de gás (eletrodo+ de Cu/Pt), outra pela qual entra o fluxo de O₂ (eletrodo- de Cu) e a última para exaustão. Entre as tubulações de entrada do biogás e O₂ (eletrodos distanciados aproximadamente 0,5cm), forma-se o arco-voltáico que incinera o gás combustível em análise.

Após a queima da amostra, um fluxo de H₂ de curta duração (até aparecer uma chama amarela), deve ser injetado lentamente com a finalidade de arrastar o biogás remanescente nas tubulações à câmara de combustão. Para evitar riscos de explosão, deverá haver pressão positiva na tubulação de H₂, a montante do registro de controle de fluxo.

O setor de absorção do CO₂, consiste de um reservatório com esferas de vidro ($\phi = 2\text{mm}$) ao qual incorpora-se 10ml de NaOH-0,1 a 0,25N. Os carbonatos formados são precipitados com 5ml de solução saturada de BaCl₂. A soda livre é titulada com HCl-0,1 a 0,25N tendo como indicador a fenolftaleína. Os dados da titulometria são aplicados à equação abaixo obtendo-se, inicialmente, o teor de CH₄ na amostra queimada:

$$\% \text{CH}_4 \text{ amostra} = (V_b - V_a) \times N \text{ HCl} \times \frac{T_a}{P_a} \times f,$$

onde: %CH₄ amostra = teor de CH₄ na amostra queimada da qual, previamente, absorveu-se CO₂, H₂ ou outros gases no aparelho de Orsat.

V_b = volume HCl (ml), gasto na titulação da prova em branco;

V_a = volume HCl (ml), gasto na titulação da amostra;

NHCl = normalidade do HCl;

T_a = temperatura do ambiente na ocasião da análise (°K);

Tabela 1 - Determinação de CO₂ pelo método de Orsat e, do fator de correção (f) utilizado nas determinações de CH₄ pelo método proposto, em amostras de gás padrão contendo 39,8% CO₂, 39,8% CH₄ e 20,4% de N₂.

Símbolos: Va = Volume de HCl (ml), gasto na titulação da amostra; \bar{m} = Médias de 15 repetições (amostras); $s(\bar{m})$ = Desvio padrão da média; cv = Coeficiente de variação (%); * = Determinações em aparelho de Orsat mod Q332-04, marca Quimis; ** = Fator de correção (f), considerando os valores de: V_b = 8,00ml, P_a = 0,9089atm, NHCl = 0,2512N, V_{Orsat} = 39,00, T_a = 294,5°K, %CH₄ gas padrão = 39,8%

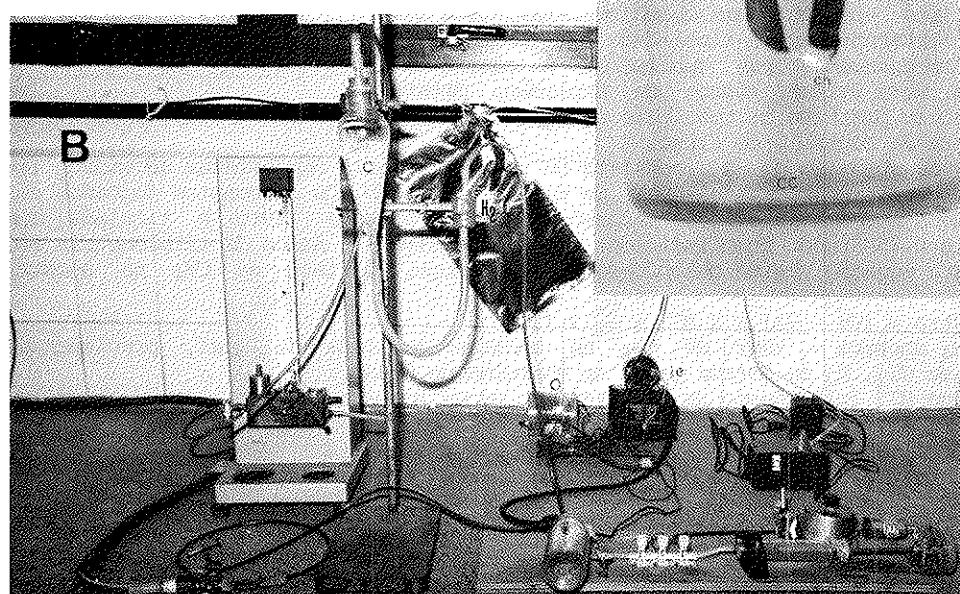
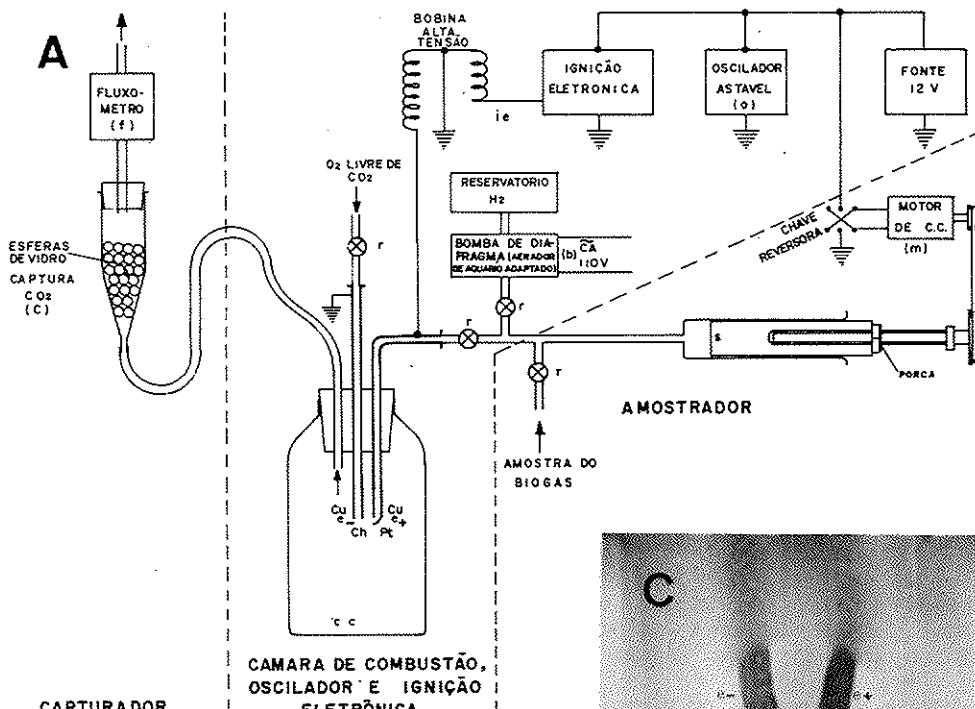
Amostra	%CO ₂ *	Va	f**
01	38,1	5,80	0,3644
02	38,2	5,85	0,3728
03	38,2	5,80	0,3644
04	38,1	5,85	0,3728
05	38,2	5,90	0,3817
06	40,4	5,90	0,3817
07	40,4	5,85	0,3728
08	40,4	5,90	0,3817
09	40,4	5,85	0,3728
10	39,0	5,90	0,3817
11	39,0	5,80	0,3644
12	38,2	5,85	0,3728
13	38,2	5,80	0,3644
14	40,0	5,80	0,3644
15	38,2	5,80	0,3644
\bar{m}	39,0	5,84	0,3718
$s(\bar{m})$	±1,0106	±0,0417	±0,0072
cv	±2,59%	±0,71%	±1,93%

P_a = pressão atmosférica no ambiente por ocasião da análise;
 f = constante obtida através de análises de amostras padrão.

A constante de correção (f), deve ser determinada para cada aparelho construído.

Figura 1 - Aparato para análise de CH_4 por combustão em arco-voltáico:
A - Diagrama esquemático; B - Protótipo do equipamento e C - Detalhe da câmara de combustão - (cc) observando-se eletrodos (e), chama (ch), arco-voltáico e formação de vapor d'água

Símbolos: cc = Câmara de combustão; ch = Chama; r = Registros; s = Seringa dosadora; f = Fluxômetro; H_2 = Reservatório de H_2 ; b = Bomba de diafragma; o = Oscilador; ie = Ignição eletrônica; m = Moto-propulsor; c = Capturador de CO_2 ; e = Eletrodos



Obtém-se pela queima de amostras padrão de gás metano e destina-se a corrigir erros oriundos da combustão incompleta, falhas no arraste, absorção do CO₂, etc.

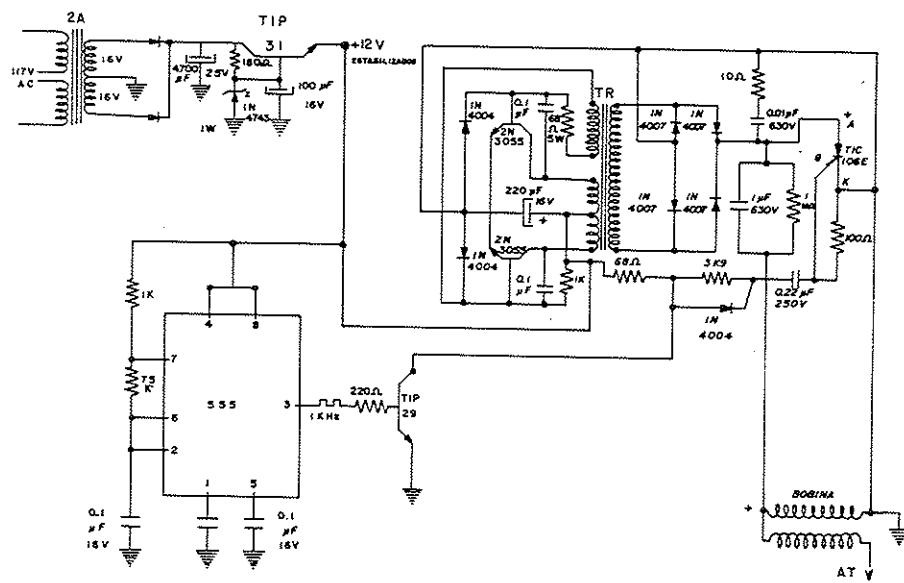
Finalmente, o teor de CH₄ no biogás, considerando que da amostra queimada já havia sido absorvido o CO₂, H₂ ou outros gases em aparelho de Orsat, pode ser calculado pela equação a seguir:

$$\% \text{CH}_4 \text{ biogás} = \frac{(100 - V_{\text{Orsat}}) \cdot \% \text{CH}_4 \text{ amostra}}{100}$$

onde: V_{Orsat} = volume dos gases previamente absorvidos em aparelho de Orsat (CO₂, H₂ ou outros gases).

Figura 2 - Diagramas eletrônicos do oscilador astável, ignição eletrônica por descarga capacitiva e fonte de corrente contínua estabilizada para 12V - 1,2A.

Símbolos: TR = Transformador com primários de 12V e 12+12V (CT), 1A e, secundário de 400V, 50mA; AT = Alta tensão (10 a 25KV de pico). Todos os resistores são de 1/2 Watt, exceto quando indicado



OSCILADOR

IGNIÇÃO ELETRÔNICA

COLETA, ARMAZENAMENTO E VOLUMETRIA DE BIOGÁS EM REATORES ANAERÓBIOS DE LABORATÓRIO*

Augusto Ferreira da Fira

Deptº de Defesa Fitossanitária
 Área de Biotecnologia Agrícola
 Faculdade de Ciências Agrônomicas UNESP
 Caixa Postal 237
 18600 Botucatu SP, Brasil

& Sergio Luiz Monteiro Salles Filho

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

Resumo

Inconvenientes dos gasômetros convencionais (rigidez e peso), podem ser atenuados com gasômetros flexíveis impermeáveis (lâminas termosoldáveis de poliéster-alumínio-polietileno). Subsequentemente, efetua-se volumetria rápida e precisa com aparato que registra e comanda ciclos de admissão/expulsão do biogás, em câmara de volume conhecido, dentro de limites de pressão estabelecidos por sensores foto-elétricos, acoplados a uma válvula solenoide de 3 vias.

Summary

Collection, storage and volume measurement of biogas laboratory anaerobic reactors

Disadvantages of conventional gas meters (rigidity and weight) may be eliminated by flexible impermeable gas meters (poliester-aluminium-polyethylene heat sealing film). As a next step, a fast and accurate volume measurement is made using an apparatus that records and commands cycles of inlet/outlet of biogas in a chamber of known volume, under pressure limits established by photodiode sensors, connected to a 3 way solenoid valve.

Os métodos disponíveis para coleta, armazenamento e volumetria de gases formados em digestores de laboratório usam em geral gasômetros de deslocamento de líquidos e telescópico (Wilson, C.W., In: - Welcher, F.J., Van Nostrand Reinhold, N.Y., 1963; Vieira, S.M.M. & col., Tecnologia, RJ, 3:26-36, 1981). Propõe-se método alternativo para armazenamento e volumetria de pequenas quantidades de biogás gerado em reatores de laboratório. Sob determinadas condições de uso, o método pode atenuar alguns inconvenientes dos gasômetros convencionais (peso e rigidez dos recipientes de vidro mais suscetíveis a quebras no manuseio), através da utilização de gasômetros flexíveis impermeáveis, confeccionados a partir de lâminas termosoldáveis de poliéster-alumínio-polietileno (Salles Filho, S.L.: -

*Parte da Dissertação de Mestrado do co-autor, FCA-UNESP, abril de 1985.

Dissertação de Mestrado, FCA UNESP, Botucatu SP, 1985). O material, após seguidos testes, mostrou-se satisfatório para armazenamento do biogás. A permeabilidade da

Figura 1 - Métodos para coleta, armazenamento e volumetria de biogás.

Símbolos: A = Cromatografia gasosa de amostras de gás metano padrão (60% CH₄ e 40% CO₂), armazenado durante 25 dias em frascos de vidro com selo de óleo mineral (4 picos de CH₄ à esquerda) e, em gasômetros de lâminas termosoldáveis de poliéster-alumínio-polietileno, durante o mesmo período (4 picos de CH₄ à direita); B = Aparelho para determinação quantitativa do biogás-valvula solenóide de 3 vias (S), recipiente de pressurização do gás (V), células fotoelétricas (cf), circuito eletrônico de comando, (ci) e contadores eletro-mecânicos de pulsos (cp); C = Armazenamento do biogás em gasômetros de plástico especial e frascos padrão de vidro com selo de óleo

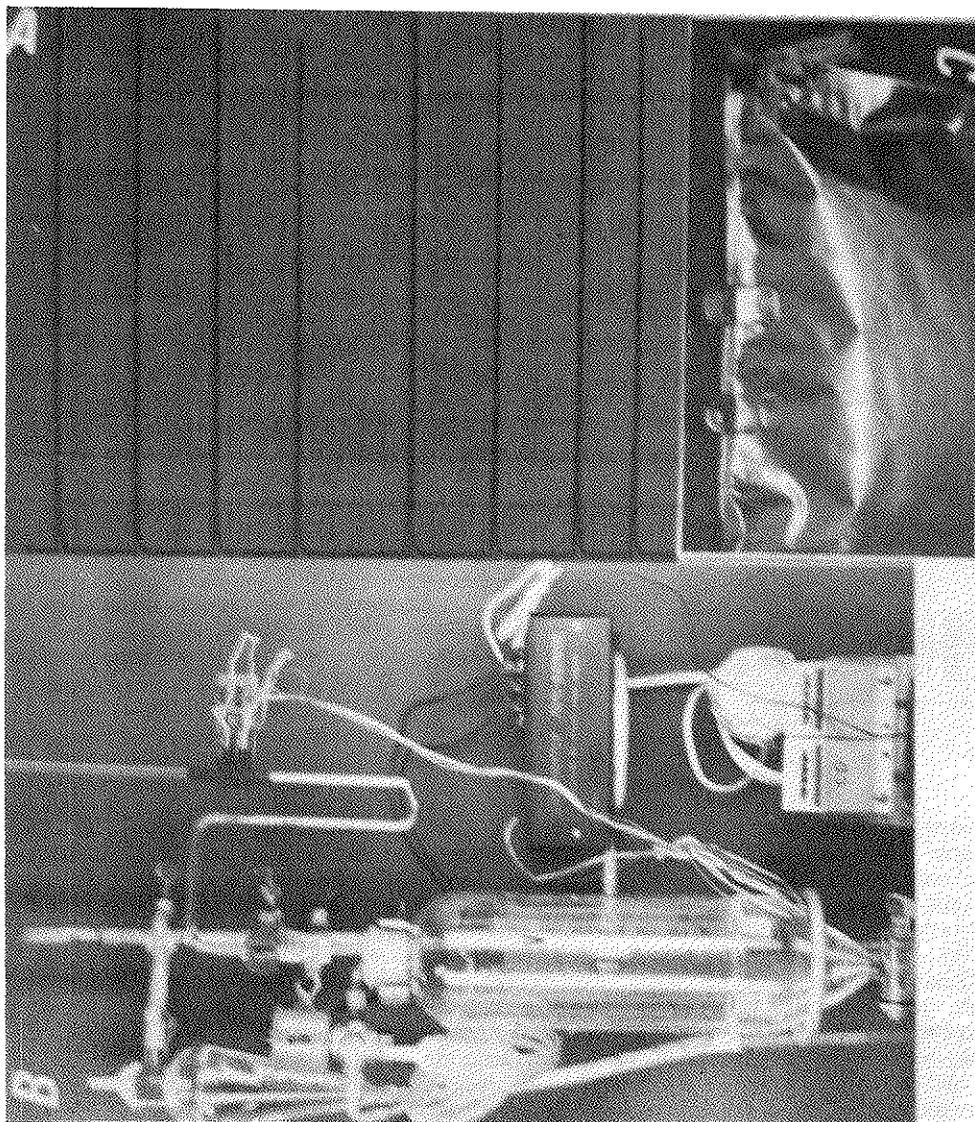
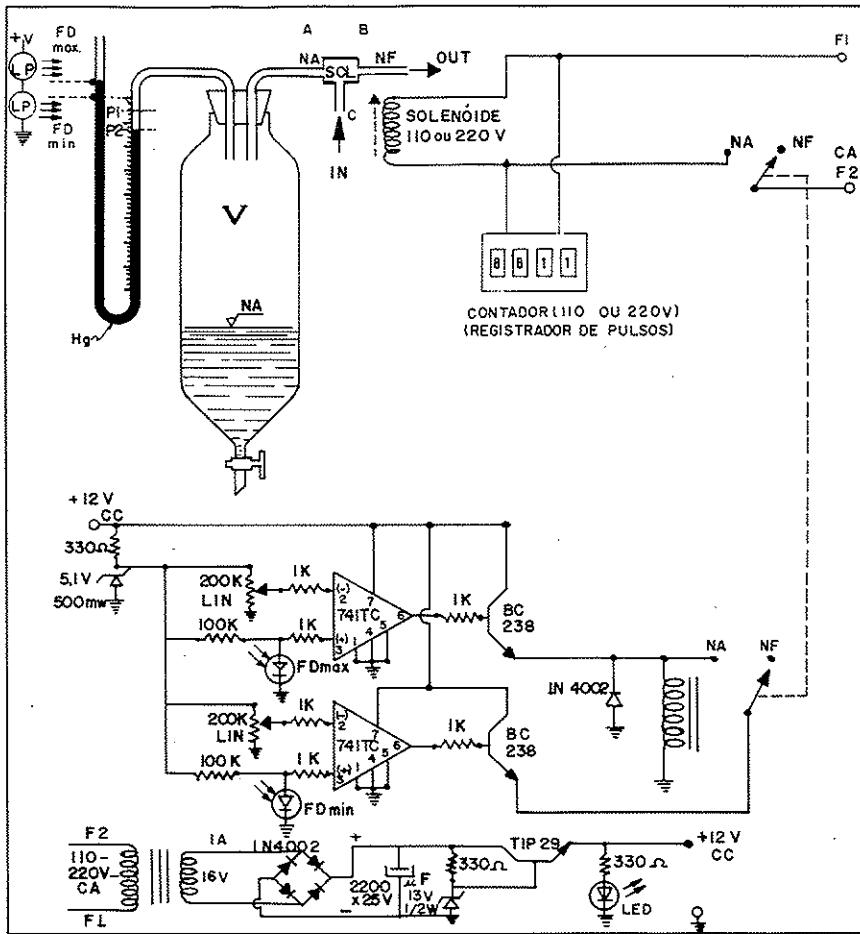


Figura 2 – Diagrama eletrônico do medidor de volume de gases.

Símbolos: NA = Normalmente aberto; NF = Normalmente fechado; F₁ e F₂ = Corrente alternada 110 ou 220V, 60Hz; FD = Fotodiodo



lâmina termosoldável quanto à troca de metano, foi testada com amostras de gás padrão com 60% de CH₄, armazenadas em gasômetros e analisadas por cromatografia gasosa (cromatógrafo CG mod. 370, amostras de 50µl transferidas com seringa especial para gases tipo 1750-LIN; coluna Porapak Q de 1,8m x 1/8" à temperatura de 60°C e temperatura de vaporização de 56°C; detector de ionização de chama à temperatura de 140°C; arraste com N₂ ao fluxo de 28 a 30ml/min; atenuação de 3×10^{-9} e velocidade do papel de 1,2cm/min), não tendo apresentado alterações até o 25º dia de armazenagem, em confronto com o conteúdo do padrão em frascos de vidro selados com óleo mineral (Figura 1). Os dados técnicos referentes às características da lâmina são apresentados na Tabela 1. A tubulação de entrada e saída do biogás é introduzida na lâmina através de furo sem folga, vedado com borracha de silicone.

Para mensurar o biogás armazenado em gasômetros flexíveis ou telescópicos ou

ainda, diretamente a partir dos reatores, idealizou-se um aparelho com base no método descrito por Van Den Berg & col. (Biotechnol. Bioeng., 16:1459-1469, 1974). Em linhas gerais, o aparelho consiste em um recipiente de volume conhecido, que poderá ser também a própria câmara de gás do reator anaeróbio, conectado a uma válvula solenóide de 3 vias a um manômetro de mercúrio com dois sensores fotoelétricos, acoplados a um circuito eletrônico de comando da válvula. O diagrama eletrônico da Figura 2 pode ser viabilizado por técnicos em eletrônica de qualquer cidade, face à sua simplicidade e facilidade de obtenção dos componentes, a um custo aproximado de Cz\$800,00 (janeiro/87). Para o caso de gases armazenados em gasômetros, uma bomba de diafragma (tipo aerador de aquário) ao qual incorpora-se uma tubulação de entrada para permitir a succão do biogás), transfere o gás do gasômetro ao recipiente de medição (Figura 2), através da via normalmente aberta do solenóide (sentido C/A), fazendo com que a coluna de mercúrio chegue ao sensor superior de comando. Neste ponto, abre-se a outra via da válvula que deixa escapar o gás do recipiente (sentido A/B). O ciclo reinicia-se quando a pressão interna do recipiente, ligeiramente acima da pressão atmosférica, é detectada pelo sensor fotoelétrico inferior. Cada ciclo é registrado em um contador de pulsos que, através de cálculo direto, fornece o volume de gás injetado no aparelho. O cálculo do volume de gás é apresentado nas equações abaixo, deduzidas a partir da lei dos gases perfeitos ($P \cdot V = n \cdot R \cdot T$).

Considerando $\Delta P = 10\text{mm Hg} = 0,0132\text{ atm}$ tem-se que:
 $V_p = \frac{V}{3,6019} \cdot \frac{273+t^{\circ}\text{C}}{t^{\circ}\text{C}}$

ΔP = Diferencial de pressão máxima e mínima, detectado pelos sensores fotoelétricos
 $t^{\circ}\text{C}$ = Temperatura em $^{\circ}\text{C}$ no momento da análise

V_p = Volume de gás por pulso (em ℓ , nas CNTP)

V = Volume do recipiente de pressurização (em ℓ)

N = Número de pulsos

V_B = Volume de biogás medido (em ℓ , nas CNTP).

Tabela 1 - Características da lâmina termosalível, empregada na confecção dos gasômetros(*)

Símbolos: (*) = Dados fornecidos pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP

Composição	Gramatura (g/m ²)	Espessura (μm)
Poliester	17,0	12,0
Verniz colorido	1,0	-
Adesivo	2,0	-
Alumínio	23,0	9,0
Adesivo	2,0	-
Polietileno	72,0	70,0
Características de permeabilidade		Unidades
Vapor d'água, 38°C, 90% UR	0,26g/m ² .dia	
Oxigênio	1cm ³ /m ² .dia.atm	
CO ₂	1cm ³ /m ² .dia.atm	

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Annales de Premier Congrès de Société Française de Microbiologie, Toulouse, 3-5 Avril 1986.

Trata-se dos resumos de cerca de 350 trabalhos apresentados no evento acima citado. O congresso abrangeu as seguintes áreas: agentes antimicrobianos; bioreatores; ecologia; metabolismo; microbiologia clínica; micologia; organização e expressão genética; patogenicidade; plasmídios; estrutura e funções celulares; taxonomia e filogenia; transporte e secreção e virologia.

Destacam-se trabalhos na área de sondas genéticas, tecnologia das fermentações e obtenção de seus subprodutos e, na virologia, ressalte-se os parvovírus.

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

FINEP - Financiadora de Estudos e Projetos - Relatório de Atividades, 1985.

Apresentado como uma prestação de contas à comunidade científica e a sociedade em geral, a FINEP traz à público seu relatório de atividades de 1985.

A FINEP é uma empresa pública, vinculada ao Ministério da Ciência e Tecnologia - MCT, com o objetivo de fomentar técnica e financeiramente estudos, pesquisas, programas e projetos de importância para o desenvolvimento do país. Distingue-se das demais agências financeiras por ser a única que dispõe de instrumentos capazes de atuar em todas as fases do processo de criação e incorporação de conhecimentos. Isto se dá através de diversas linhas de atuação, a saber:

ADTEN - Desenvolvimento Tecnológico, onde são financiados projetos de engenharia básica no país com desenvolvimento tecnológico; implantação de centros de pesquisa e desenvolvimento; comercialização pioneira; compra e absorção de tecnologia, no País ou no exterior; controle de qualidade; e desenvolvimento de produtos e processos.

AJSC - Elaboração de Estudos e Projetos, onde são financiados estudos e projetos da seguinte natureza: planos, diretrizes e estudos setoriais dentro dos Programas Nacionais e Regionais; estudos de viabilidades; projetos básicos e executivos realizados no país; e estudos e projetos visando ampliação de capacidade técnica, administrativa, produtiva ou operacional.

ACN - Consultoria Nacional, contemplando inversões internas destinadas ao aprimoramento técnico de empresas consultoras; desenvolvimento de sistemas de informação e controle de gerenciamento de projetos; elaboração de manuais técnicos; aquisição de instrumentos de medidas; desenhos e reproduções nacionais, treinamento de pessoal; e exportação de serviços de consultoria.

O exercício de 1985 caracterizou-se por uma série de mudanças na FINEP. Do ponto de vista político a mais importante das mudanças realizadas foi a alteração do Conselho da FINEP, que é o órgão de definição da política estratégica da empresa e de fiscalização orçamentária da mesma. A mudança garante a participação no Conselho de representantes de várias entidades da sociedade civil, além de entidades estatais e privadas, ligadas às áreas científica e tecnológica.

Do ponto de vista administrativo foi criada a Diretoria de Planejamento, que entre outras tem a função de aferir os resultados dos investimentos feitos, fornecendo elementos para balizar o planejamento da empresa.

Vários departamentos foram criados a partir de fusões ou reagrupamentos de conjuntos técnicos antes dispersos. Assim pode-se citar os departamentos: DAC - Departamento de Apoio à Empresa Nacional de Engenharia e Consultoria; DAE - Departamento de Articulação com Entidades Estatais; DAN - Departamento de Agropecuária e Recursos Naturais; e DTE - Departamento de Transporte e Energia.

Com relação às prioridades, seguindo as orientações do MCT, estas passam a concentrar-se em duas áreas: estudos e pesquisas para soluções de problemas sociais; e pesquisas científicas e desenvolvimento tecnológico em informática, biotecnologia, química fina e novos materiais.

Estas prioridades deverão seguir as diretrizes seguintes: preservar os grupos consolidados, ou em fase de consolidação, nos quais a FINEP investiu maciçamente nos últimos anos, sempre que os padrões de qualidade sejam obedecidos; apoiar os grupos que atuem nas áreas de fronteiras do conhecimento. Grupos emergentes não estarão "a priori" excluídos das diretrizes de apoio da FINEP, recebendo portanto atenção e recursos sempre que devidamente solicitados.

Em relação a política tecnológica serão estimuladas ações tendo em vista três objetivos complementares: capacitação tecnológica da indústria brasileira; domínio de tecnologia em áreas de fronteira; e difusão dos conhecimentos tecnológicos com real impacto na área social.

Fazem também parte do Relatório de Atividades quadros demonstrativos do desempenho operacional, especificando as operações apoiadas pela empresa no exercício 1985.

Antonio Carlos Ramos Gonçalves
EMBRAPA
Ed. Super Center Venâncio, 2000
70040 Brasília DF

Friedman, R.M. - Interferons: a primer. New York, Academic Press, 151p., 1981. US\$ 22.50.

O volume, escrito por um cientista de longa experiência no campo, pretende realizar um sumário de conhecimento sobre os interferons baseado numa linguagem simples, para torná-lo acessível a estudantes, médicos, leigos interessados e cientistas de outras áreas.

Acreditamos, também, que um dos intuito do Dr. Friedman foi tentar colocar os interferons e suas possibilidades terapêuticas em uma ótica equilibrada, já que o livro foi preparado e lançado no mercado por ocasião de uma enorme e amarga (para os "interferonologistas") onda de fantasiosa publicidade sobre os efeitos clínicos dos interferons.

O livro distribui-se, nas suas 131 páginas, em 10 capítulos - introdução, titulação de interferons, purificação e propriedades dos interferons, produção dos interferons, mecanismos de ação anti-viral, outras ações dos interferons, interferons e convalescência de infecções virais, uso clínico dos interferons, futuro dos interferons, o futuro é agora. A linguagem é simples, sem jargões científicos exagerados e procura o autor ilustrar dados científicos fundamentais com a descrição simplificada de experimentos. No final de cada capítulo, há uma bibliografia, resumo e, no final do livro, um glossário que facilitará a compreensão do texto. Completa o volume um índice remissivo.

O livro alcança, sem dúvida, o resultado pretendido pelo autor, da difusão de conhecimentos sobre os interferons, para um público mais amplo. A distribuição e a cobertura da matéria é equilibrada, trazendo ao leitor não especialista um bom conhecimento do assunto.

Ressente-se de informações mais atuais e de raros enganos como, por exemplo, que os interferons não são antigenicos para a sua própria espécie (p.23), que o bloqueio da síntese de interferon não é causado pelas moléculas de interferon (p.38) ou que os interferons recombinantes dificilmente seriam empregados na clínica (p.118).

Num campo onde o conhecimento acumula-se rapidamente, e portanto, a informação torna-se obsoleta na mesma velocidade, um livro publicado em 1981 poderia deixar de ter interesse. Contudo, graças ao fato de ser o único volume sobre os interferons escrito em linguagem fácil, com um glossário apropriado e com a feliz cobertura do assunto, é indicado para estudantes, profissionais da área da saúde,

microbiologistas e outros interessados não especialistas.

Seria certamente muito útil se o Dr. Friedman se dispusesse a organizar uma segunda edição, nesta difícil tarefa de escrever ciência para o não especialista.

Romain R. Golher
Deptº de Microbiologia
ICB//UFMG
Caixa Postal 2486
30161 Belo Horizonte MG

Hamer, S.K., ed. - *Genetic engineering and biotechnology: yearbook 1986/87. Part 1 - USA. Part 2 - Rest of the world.* Amsterdam, Elsevier, 1986. US\$ 800.00.

A euforia, sobre os ganhos de capital, que seriam proporcionados pela nova biotecnologia, com o apoio da grande ciência biológica - prevaleceu no Brasil, pelo menos no ambiente técnico-científico e governamental.

Nos países desenvolvidos, o triunfalismo vem dando lugar a posições mais cautelosas, na medida que investidores e o público (principalmente motivado pela imprensa popular) se tornaram mais conformados com o fato de que a transformação de uma idéia, a nível de laboratório (pesquisa científica) necessita 15-20 anos para se converter em negócio significativo.

No começo dos anos 70, a empolgação tomou conta dos investidores de capital de risco e estimulou - nos países não desenvolvidos - a vontade política dos agentes governamentais. Consequentemente, surgiram os Planos e Programas Nacionais de Biotecnologia.

No Brasil, a vontade política foi logo reconhecida, mundialmente, através do discurso governamental chamado PRONAB - Programa Nacional de Biotecnologia, algo reduzido à simples verbalização, sem evidências concretas de resultados positivos.

Depois, veio outro documento - o PADCT-Biotecnologia, com promessas de aporte de recursos do Banco Mundial, da ordem estimada de US\$90 milhões para 5 anos. Seguiu-se uma campanha nacional de promoção, a favor do programa e, com a entrada do novo governo federal, a ação (velada) contrária ao programa, inclusive por ex-adeptos do governo anterior que aprovara o empréstimo e a filosofia do PADCT-Biotecnologia. Apesar da maior pretendente efetividade, no PADCT-Biotecnologia, a ação governamental não chegou a ganhar visibilidade internacional, como acontecera com o PRONAB (na realidade, um "nati-morto"!).

Enquanto a euforia tomava conta do segmento técnico-acadêmico e burocrático-governamental, a empresa privada nunca deu mostras de envolvimento, nem empolgação. Não obstante, parece não ter ficado estática, pois, no "Yearbook 1986/87", há 10 companhias brasileiras mencionadas.

Ganharam também notoriedade, para o Brasil, fundos de apoio à P&D e a Sociedade Brasileira de Microbiologia (certamente devido à sua atividade em "fermentação").

Assim, as 10 empresas brasileiras que, certamente, não esgotam o número de companhias que atuam em biotecnologia, no país, passaram a figurar ao lado de outras 1.450 organizações que compõem o universo do "Yearbook", para 38 países.

Vale registrar, a propósito, que alguns países aparecem com número menor de companhias, como a Áustria, com 6; China, 5; Índia, 4; Portugal e México, com 2 cada. Há nações industrializadas cujo número ultrapassa a casa das 40 empresas. Mas merecem atenção os países, com menor extensão territorial e número populacional, nos quais o número de biocompanhias é significativo: Israel, com 20; Austrália, 22; Finlândia e Irlanda, 12 cada.

O Vol. 1, dedicado exclusivamente aos EUA, contém dois anexos: composição de Associações de Empresas de Biotecnologia e tabela de focos de atuação ("Fields of focus"), na qual nem todas as empresas estão incluídas, certamente devido à falta de informações pertinentes.

O Vol. 2, contém quase 600 páginas e engloba os restantes 37 países, com mais ou menos 950 organizações. Além disso, contém 643 páginas e está dividido em duas partes: empresas de engenharia genética (cerca de 300) e que atuam em outras áreas

de biotecnologia (aproximadamente 150).

O índice contém informações sobre empresas e demais organizações, com dados de subordinação/articulação, o que já consiste, de per se, em importante informação.

A impressão, em papel couchê, não é das melhores, tendo sido adotada a

Figura 1 - Participação (%) de empresas de engenharia genética e biotecnologia. EUA, Canadá, Europa, Reino Unido, Ásia-Afroáfrica-Oceania, Japão, Brasil

EMPRESAS DE BIOTECNOLOGIA

TOTAL = 1023

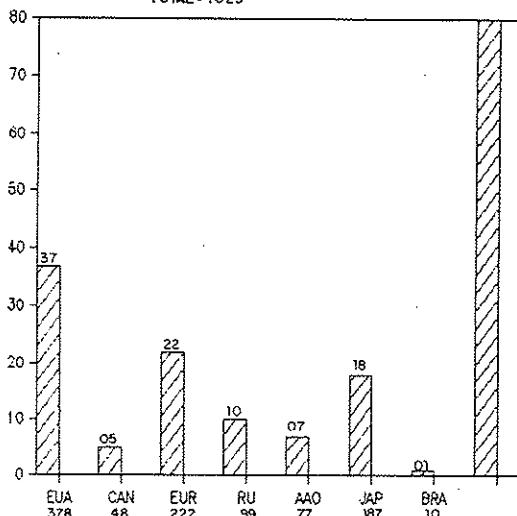
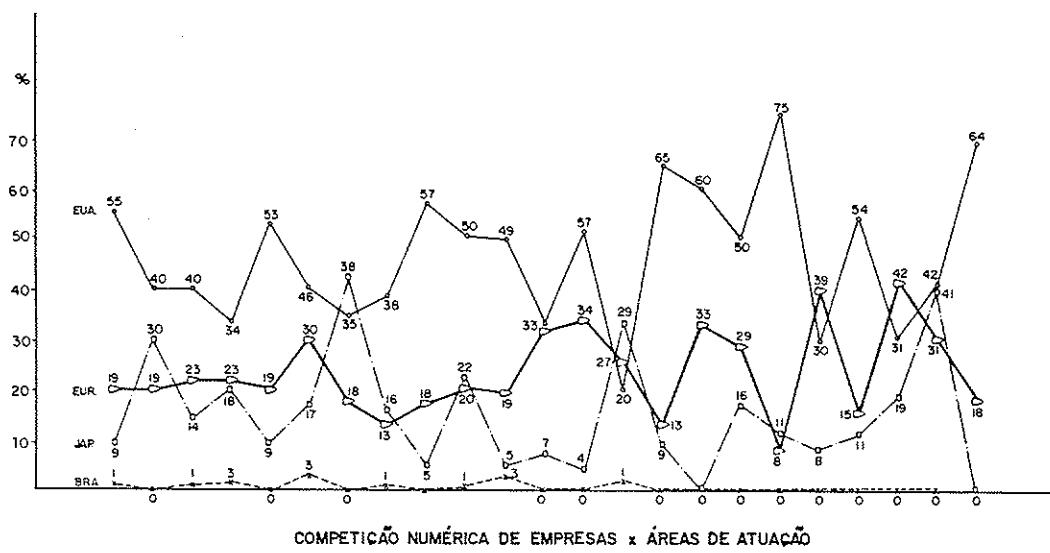


Figura 2 - Competição numérica (%) entre EUA, Europa (exceto Reino Unido), Japão e Brasil, por área ou foco de interesse em biotecnologia



fotoreprodução a partir de texto datilografado. Há falhas de revisão, principalmente na redação de nomes científicos de microrganismos. Na parte referente ao Brasil, são lamentáveis os erros nos nomes das organizações e nos endereços. Há uma empresa para a qual o nome da rua foi omitido. Fica a impressão de que, os autores não conhecem, formalmente, a organização informativa de endereçamento, nem tiveram maiores preocupações em padronizar os elementos informativos.

Mas, o conteúdo da publicação é bastante rico, para os interessados no universo da biotecnologia. Serve de guia permanente a empresários, investidores, profissionais interessados em desenvolvimento de biotecnologias e bioproductos. Os agentes governamentais deveriam analisar, cuidadosamente, cada tipo de empresa, para maior objetividade em suas decisões para concessão de financiamentos ou estimulação de oportunidades.

O acervo de informações permite a elaboração de documentos avaliativos, sob diferentes aspectos. É possível, por exemplo, determinar a população de empresas que atua em diferentes áreas, entre as 26 principais, que aparecem no "Fields of focus", como aparece nas figuras.

Para ingressar no "biobusiness", o "Yearbook" será útil, pois fornece informações sobre a concorrência, embora este tipo de informação deva resultar de análises e tratamentos mais particularizados. Entretanto, será preciso ficar atento para o fato de que o simples número de empresas por país ou por área de atuação é um elemento informativo relativamente simplificado. São necessárias análises adicionais; principalmente dos produtos oferecidos e a posição das concorrentes no mercado, entre outras.

O grande problema, pelo menos para as organizações governamentais, aqui incluídas as universidades e os institutos de pesquisa, é o preço da obra: US\$800.00. Para a empresa comercial, o principal ponto a ser definido é se a companhia está orientada para a aquisição e tratamento de informações, coisa que o "Yearbook" requer, para ser aproveitado ao máximo.

João S. Furtado
Ex-Presidente da Sociedade Brasileira
de Microbiologia
Ex-Editor da Revista de Microbiologia
Diretor Executivo de TECHNOVA
Inovações Técnico-Científicas SC Ltda
Rua Getúlio Vargas Filho, 445
04318 São Paulo SP

Journal of Industrial Microbiology, 1(2):69-137, 1986. US\$ 141.00.

O periódico "Journal of Industrial Microbiology" é uma publicação da "Society for Industrial Microbiology", lançado recentemente pela Elsevier Science Publishers, Amsterdam, The Netherlands. É uma revista internacional com a finalidade de publicar trabalhos de pesquisa, revisões, comunicações rápidas e cartas ao Editor, nas áreas de biotecnologia, fermentações, microbiologia ambiental, biodegradação, biodeterioração, controle de qualidade e outros campos de microbiologia aplicada.

O corpo editorial da revista é constituído de 60 revisores, sendo 57 dos Estados Unidos, 2 do Canadá e 1 da Austrália. Embora haja uma concentração de revisores americanos, eles são de diferentes regiões do país, o que permitirá boa diversificação de idéias.

O exemplar que tivemos oportunidade de analisar foi o volume 1, número 2 de junho de 1986, sendo os artigos variados e bem apresentados, com impressão clara dos gráficos e fotografias, além de um papel de ótima qualidade.

O tempo gasto para a publicação dos artigos foi de um ano, no entanto, após o aceite o tempo variou de 4 a 7 meses.

Este periódico será de grande utilidade para os profissionais da área.

Os interessados em publicar trabalhos na revista devem encaminhar o original e 3 cópias do artigo em inglês para G.E. Pierce (Editor-in-Chief), Battelle Memorial

Institute, 505 King Avenue, Columbus, OH 43201-2693, U.S.A. Não se paga pela publicação do trabalho.

A assinatura anual da revista está custando Dfl. 409.00 (U\$160.50) e pode ser obtida escrevendo-se para Elsevier Science Publishers B.V., Journals Department, P.O. Box 211, 1000 AE Amsterdam, The Netherlands.

Walter Vieira Guimarães
Deptº de Biologia Geral
Universidade Federal de Viçosa
36570 Viçosa MG

Kon, O.L.; Chung, M.C.M.; Hwang, P.L.H.; Leong, S.F.; Ioke, K.H.; Thiagarajah, P. & Wong, P.T.H., eds. - *Contemporary themes in biochemistry. Proceedings of the Fourth Federation of Asian and Oceanian Biochemists Congress, Singapore, November 30 - December 5, 1986*. New York, Cambridge University Press, vol.6, 715p., 1986. US\$ 49.50.

Este volume apresenta os resumos das comunicações apresentadas no IV Congresso da Federação dos Bioquímicos da Ásia e Oceania, realizado em Singapura em dezembro de 1986. O livro contém 357 comunicações nos diversos campos da bioquímica. Os resumos variam de autor para autor mas todos contêm os dados mais importantes das comunicações apresentadas na forma de cartazes. As comunicações poderão ser lidas não só por aqueles pesquisadores interessados em conhecer o nível da bioquímica em países com desenvolvimento similar ao nosso, como também, por aqueles que trabalham nos temas abordados.

Convém destacar que os temas estão situados no contexto da pesquisa bioquímica mundial e foram grupados da seguinte maneira: Proteínas (14), Enzimas (36), Química clínica (13), Doenças tropicais (7), Estrutura dos genes (12), Ácidos nucleicos (4), Imunoquímica (5), Bioquímica de microrganismos (9), Nutrição (15), Metabolismo intermediário (4), Expressão gênica (3), Processamento pós transcrição e pós-tradução (4), Glicoproteínas e proteoglicanas (9), Bioquímica farmacológica (14), Bioquímica marinha (9), Bioquímica vegetal (29), Hormônios, mediadores e sinais (19), Oncogenesis e mutagenesis (6), Fatores de crescimento e oncogenes (4), Bioquímica aplicada (17), Bioquímica analítica (13), Biofísica química (9), Neuroquímica (17), Bioquímica das enfermidades humanas (16), Lipídeos (12), Eicosonoides (4), Estrutura e função das membranas (12), Outros tópicos (4). A bioquímica de microrganismos (total de 25 comunicações) não está circunscrita à sua seção específica mas se encontra distribuída ao longo de várias seções.

O nível das comunicações é variável, abrangendo desde a identificação, isolamento e sequenciamento de genes, fusão interespécies de protoplastos, isolamento de enzimas até a confirmação de que é possível usar enzimas hidrolíticas de microrganismos isolados na região para despolimerizar resíduos agrícolas.

O maior número de comunicações em Bioquímica de microrganismos era originário da Índia, seguida daquelas do Japão e da Austrália e perfaziam 7% do total das comunicações apresentadas.

O presente livro serve como referência dos trabalhos em andamento na Índia, Japão, Singapura, Austrália, Tailândia e demais integrantes da Federação.

Glaci T. Zancan
Deptº de Bioquímica
Universidade Federal do Paraná
Caixa Postal 939
80000 Curitiba PR

Korhonen, T.K.; Daves, E.A. & Makela, P.H., eds. - *Enterobacterial surface antigens: methods for molecular characterisation*. New York, Elsevier Science Publishers, 1985.

Se você leitor, trabalha ou se interessa sobre o assunto deste livro, não deve

deixar de adquiri-lo ou então recomendar a biblioteca de sua instituição para fazê-lo.

O texto está baseado no programa do "workshop" realizado em Helsinque, em 1984, sob auspícios da Federação Européia das Sociedades de Microbiologia e Sociedades de Bioquímica, Biofísica e Microbiologia Finlandesa. São 31 autores europeus que escreveram 24 capítulos, sendo os oito primeiros revisões e os demais sobre técnicas. Embora o livro tenha sido escrito na sua maior parte por pesquisadores escandinavos (12 finlandeses e 10 suecos) ele apresenta uma bibliografia internacional e bem atualizada.

Os três primeiros capítulos enfocam as proteínas da "outer membrane", nos seguintes aspectos: estrutura e função, síntese, assentamento e regulação. Os dois capítulos seguintes referem-se as fimbrias de *E. coli* tanto nos seus aspectos estruturais como genéticos. Os três capítulos seguintes envolvem a resposta sorológica aos componentes da superfície bacteriana.

Estes capítulos mencionados acima são relativamente curtos (não mais do que 10 páginas, em média) mas fornecem informações abundantes e atualizadas, e o que é característico deste livro, fácil entendimento.

Os capítulos restantes são dedicados a métodos de estudos. São detalhados, profundos e quase todos apresentam uma avaliação crítica no seu final quanto as potencialidades e aplicações.

São apresentados os seguintes métodos gerais: fracionamento de membranas; eletroforose em gel de poliacrilamida para análise de proteínas; marcadores de superfície: "cross-linking"; imunoeletroforese cruzada; microscopia eletrônica; isolamento e análise eletroforética de lipopolissacarídeos e seleção e detecção de colônias empregando iodo-proteínas. Alguns capítulos dedicam-se a métodos específicos como por exemplo, isolamento de porinas, ensaios de aderência, purificação de fimbrias e purificação da proteína OmpA de *E. coli*.

Flávio Alterthum
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP

McGregor, W.C., ed. - *Membrane separations in biotechnology*. New York, Marcel Dekker, 386p., 1986. US\$ 78.00.

Este livro contém introdução, 13 capítulos, um apêndice e um índice remissivo. Não há índice de autores. Os capítulos tratam de vários temas, todos muito bem escolhidos. "Seleção e uso de membranas de ultrafiltração", escrito pelo organizador, tem 34 páginas, 33 referências e é escrito do ponto de vista do usuário de membranas. Trata, na maior parte, do desenvolvimento do processo de fracionamento de extrato tímico, trabalho que já alerta o usuário para os muitos cuidados e ensaios requeridos para se chegar a um processo de separação por membranas. Alguns dados comparativos (desempenho real x nominal) são preciosos.

Outros capítulos de interesse geral: "Cell harvesting" (Hanisch, Cetus Corporation); "Membrane separations in the production of alcohol fuel by fermentation" (Leeper, EG&G), "Membrane separations in food processing" (Kosikowski, Cornell); "Membrane bioreactors" (Cheryan e Meharia, Univ. Illinois); "Waste treatment with reserve osmosis membranes" (Winfield, Courtaulds); "Plant tissue culture using membranes" (Shuler, Cornell). Outros são mais específicos: "Protein ultrafiltration some neglected considerations" (Sirkar e Prasad, Stevens Inst. Tecnol.) trata da deterioração no desempenho de membranas, indicando como esta pode ser evitada através de um manejo cuidadoso do meio e limpeza das membranas; "Recovery of an extracellular antibiotic by ultrafiltration" (Gravatt e Molnar, Merck) é um bom relato de experiência dos autores, em uso de membranas no processo de fabricação de cefamicina C.

A contribuição de Mattiasson e Ling (Lund), Ultrafiltration affinity

"purification: a process for large-scale biospecific separations" descreve um trabalho interessante, a nível de laboratório. Dois artigos referem-se a fracionamento de plasma: "Practice of ultrafiltration-diafiltration in the plasma fractionation industry" (Mitra e Ng, Cutter/Miles) e "Blood plasma processing by electrodialysis" (Bing, Didonna e Regan, do Center for Blood Research, Boston e Strong, de Harvard). O primeiro destes dois textos mostra bons resultados do uso de processos de membranas na concentração de macrosolutos e remoção de microsolutos; mostra que o desejado fracionamento de macrosolutos ainda não é uma realidade, a nível de processo industrial; a segunda contribuição evidencia o potencial de eletrodiálise no isolamento de componentes minotários de plasma.

"The application of artificial organs to biotechnology" (Leonard, Columbia) é um relato sobre o uso terapêutico de membranas, em rins artificiais. O apêndice é uma lista, comentada, de 15 textos e resenhas sobre membranas, e ajuda o leitor a completar a sua bibliografia.

O livro cobre vários temas de interesse; há um certo grau de redundância, com algumas matérias aparecendo em mais de um capítulo. Esta redundância vem, em partes do fato de existir redundância de conceitos, no campo, por exemplo, um bioreator de membrana é visto tanto como uma unidade integral ou como um conjunto de tanque com agitador mais bomba e módulo de separação (diafiltração, ultrafiltração, etc.).

Também se observam algumas lacunas: por exemplo, o capítulo sobre eletrodiálise só trata de plasma; o uso de eletrodiálise em processamento de alimentos ou em indústrias de processo não é examinado, de fato, Kosikowski remete o leitor ao capítulo de Bing e colaboradores, mas este só trata de plasma.

A exatidão das informações prestadas nos diferentes capítulos é muito variável, o autor desta resenha encontrou no artigo de Leeper algumas citações de trabalhos conhecidos, que não são o bastante fiéis aos textos originais. De onde se conclui que resenhas podem ser e são extremamente úteis, mas não desobrigam o leitor de consultar a literatura original.

O texto não é útil como introdução aos processos de separação por membranas, exige alguma familiaridade prévia com conceitos e métodos. Também não é extremamente atualizado ou abrangente, pelo que já foi exposto anteriormente. Entretanto é óbvio que, nesta área, não se tem livre acesso à informação "mais recente", esta não é livremente disponível e o que está contido neste livro já forma um acervo de informações muito valioso. O livro é uma útil adição à biblioteca do pesquisador desta área. É também, referência obrigatória para os usuários, presentes ou futuros, de processos de separação por membranas, principalmente aqueles que desejam ter informação mais crítica do que a prestada pelos fornecedores de membranas e equipamento associado.

Fernando Galenbeck
 Instituto de Química UNICAMP
 Caixa Postal 6154
 13081 Campinas SP

UNDP/WORLD BANK/WHO - Tropical disease research: seventh programme report. 1 - Overview. Geneva, WHO, p.1/3-1/11, 1985.

Este "relatório" descreve as atividades do "Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases" durante o biênio 1983-1984, apresentando dados (tabelas e fotografias em quatro cores) de interesse dos pesquisadores, estudantes de pós-graduação, jornalistas e administradores dos setores da Saúde. O primeiro capítulo, de caráter introdutório, distribuído para divulgar o "relatório", contém dados sobre Quimioterapia e desenvolvimento de drogas, Vacinas e imunoterapia, Testes para diagnóstico, Pesquisa básica, Pesquisa de campo e outros tópicos referentes à malária, esquistossomose, filariose, tripanosomiases, leishmanioses e lepra. O conteúdo do "relatório" atende aos interesses daqueles que se iniciam nessa área, bem como dos pesquisadores bastante familiarizados com as doenças tropicais. Embora tenha preço estipulado, cópias podem ser solicitadas gratuitamente por pesquisadores e/ou instituições de países em desenvolvimento no

endereço já referido da Organização Mundial da Saúde.

Wilson C. de Araújo
FINEP
Av. Rio Branco, 124
20042 Rio de Janeiro RJ

UNDP/WORLD BANK/WHO - Tropical disease research: seventh programme report, 1 january 1983 - 31 December 1984. 11 - Epidemiology. Geneva, WHO, p.11/3-11/10, 1985.

O capítulo 11, referente ao programa estabelecido pela WHO para treinamento e pesquisa na área de doenças tropicais, trata da parte de epidemiologia principalmente em Zâmbia.

Estudos longitudinais multidisciplinares foram realizados em uma população de 154 pequenas cidades, totalizando cerca de 10.000 habitantes. A malária, esquistossomose e tripanossomíase africana são frequentes nesta área. As crianças apresentam-se desnutridas e muitos casos de malária por *Plasmodium falciparum* são resistentes à cloroquina. O principal Centro de Pesquisa fica localizado em Ndola. A filariose é endêmica e a lepra ocorre numa proporção de 26 casos novos para 1000 habitantes. Para treinamento em epidemiologia, aplicada ao estudo das doenças tropicais, os médicos de Zâmbia têm recorrido à Universidade de Nairobi e aos Centros Médicos de Tanzânia. Ainda resta muito por fazer neste território africano, tão pobre de recursos médicos e humanos.

Carlos da Silva Lacaz
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo
Av. Dr. Enéias de Carvalho Aguiar,
470
05403 São Paulo SP