

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 18 Número 4 Out. Dez. 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 duplícata (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 ; 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 "Bergery'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 Bergery deverá ser mencionada entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cid. Universitária - USP

05508-900 — São Paulo/SP

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

São Paulo — Brasil

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

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

Diretores Associados Bacteriologia Walderez Gambale
Micologia Maria Therezinha Martins
Virologia Claudete Rodrigues Paula
Maria Lúcia Rácz

Aquisição 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 Vice-Presidente
Milton de Uzeda Flávio Alterthum
Instituto de Microbiologia UFRJ Instituto de Ciências Biomédicas USP
Centro de Ciências da Saúde Deptº de Microbiologia
Bloco I — Ilha do Fundão Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
21941 Rio de Janeiro RJ 05508 São Paulo SP

Secretário Geral Tesoureiro
Leonardo Perego Jr. Walderez Gambale
Faculdade de Ciências Instituto de Ciências Biomédicas USP
Farmacêuticas USP Deptº de Microbiologia
Cidade Universitária Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP 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
Dep. de Microbiologia - ICB II - USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL
Site: www.revmicro.cjb.net

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 18 OUTUBRO-DEZEMBRO 1987 NÚMERO 4
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 18(4)

CONTEÚDO

CONTENTS

Silva, T.C.P.G. da; Gallo, M.E.N.; Almeida, S.M.R. de; & Palmeira, E.N.	301 Índices bacteriológico e morfológico no auxílio ao diagnóstico e tratamento dos pacientes hansenianos*	Bacteriologic and morfologic index for diagnosis during the treatment in leprosy patients
Guerreiro, H.M.N.; Hagge, S.; Conceição Fo, J.L.; & Barbosa, H.S.	305 Vaginite por <i>Gardnerella vaginalis</i> - prevalência e avaliação de metodologia para seu diagnóstico	<i>Gardnerella vaginalis</i> vaginitis - prevalence and methodology evaluation for it's diagnosis
Freitas, A.C. de; Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D.	311 Sobrevivência de <i>Yersinia enterocolitica</i> em diversos sistemas aquáticos experimentais	Survival of <i>Yersinia enterocolitica</i> in different experimental aquatic systems
Valentini, S.R.; Leite, C.Q.F.; Giannini, M.J.S.M.; & Falcão, D.P.	318 Indicadores de contaminação fecal e enteropatógenos em águas de recreação	Indicators microorganisms and enteropathogens in recreational waters
Falcão, D.P.; & Shimizu, M.T.	324 Avaliação de técnicas de isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> a partir de fezes de camundongos infectados experimentalmente	Evaluation of techniques and culture media for isolation of <i>Yersinia enterocolitica</i> from mice's stools experimentaly infected
Rabinovitch, L.; & Vasconcellos, F.J.M. de;	330 Um novo meio para detecção e contagem de <i>Bacillus cereus</i> em alimento	A new medium for the detection and enumeration of <i>Bacillus cereus</i> in food
Gomes, M. de F.F.F.; & Furlanetto, S.M.P.	335 Grupos de bactérias isoladas a partir de amostras de fígado de bovino	Bacterial groups isolated from beef liver
Nascimento, G.G.F. do; & Tavares, F.C.A.	344 Ocorrência de plasmídios em linhagens bacterianas fixadoras assimbióticas de nitrogênio	Detection of bacteria plasmids in non-symbiotic fixer strain
Fava, S.D.C.; Netto, C.F.; Costa, E.O.; & Cuoe, L.C.	349 Distribuição geográfica e morbidade da paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo	Geographical distribution and morbidity rate of paracoccidioidomycosis in São Paulo State Brazil

Mezzari, A.; Cauduro, P.F.; & Dias, C.A.G.	357	Relato de um caso de dermatofitose pelo <i>Trichophyton tonsurans</i> no Rio Grande do Sul	<i>Trichophyton tonsurans:</i> <i>description of a case</i> <i>seen in the State of</i> <i>Rio Grande do Sul,</i> <i>Brazil</i>
Giesbrecht, A.M.; Barbosa, R. de C.S.B.C.; & Paula, C.R.	360	Atividade antifúngica in vitro de algumas amidas naturais e seus precursores	<i>Antifungic activity of</i> <i>natural amides</i>
Gambale, W.; Paula, C.R.; Correa, B.; Purchio, A.; & Martins, M.T.	363	Avaliação da microbiota fúngica em lodo digerido submetido a tratamento químico e térmico	<i>Valuation of molds and</i> <i>yeasts in raw sludge</i> <i>after thermic and</i> <i>chemical treatment</i>
Paula, C.R.; Costa, E.O.; Pires, M. de F.C.; Coutinho, S.D.A.; Carvalho, V.M.; Castilho, W.; & Moral, M.S.	366	<i>Scopulariopsis</i> <i>brevicaulis:</i> agente etiológico de dermatose em cães e equinos	<i>Scopulariopsis</i> <i>brevicaulis:</i> etiologic agent of dermatosis in dogs and horses
Jerez, J.A.; Candeias, J.A.N.; Durigon, E.L.; Rácz, M.L.; & Ribeiro, L.C.	371	Anticorpos anti-rotavírus em bovinos	<i>Antibodies against</i> <i>rotavirus in calves</i>
Couceiro, J.N. dos S.S.; Couceiro, E. dos S.S.; & Machado, R.D.	375	Circulação simultânea de myxovírus e paramyxovírus numa comunidade aviária ornamental	<i>The simultaneous</i> <i>circulation of</i> <i>myxovírus and</i> <i>paramyxovírus in a</i> <i>ornamental bird</i> <i>community</i>
Salles Fº, S.L.M.; & Eira, A.F.	380	Biogênese do metano em condições de elevada acidez e alcalinidade nula: I. Perspectivas de um novo conceito operacional para tratamento anaeróbico de efluentes industriais	<i>Methane biogenesis at</i> <i>low pH and null</i> <i>alkalinity conditions:</i> I. <i>Perspectives of a</i> <i>new operational concept</i> <i>in the anaerobic</i> <i>treatment of industrial</i> <i>wastewaters</i>
Informação Técnico-Científica SBM	391		

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

ÍNDICES BACTERIOLÓGICO E MORFOLÓGICO NO AUXÍLIO AO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DOS PACIENTES HANSENIANOS*

Tania Cristina Pedrosa Guedes da Silva

Maria Eugenia Noviski Gallo

Sonia Maria Rocha de Almeida

& Eloisa Nunes Palmeira

Setor de Hanseníase/FIOCRUZ

Av. Brasil, 4365, Manguinhos

21040 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Pela evidenciação dos índices bacteriológico e morfológico em esfregaços do muco nasal e linfa dos lóbulos auriculares e cotovelos de pacientes hansenianos, observou-se uma maior positividade do IB e IM nos esfregaços da linfa e, entre estes, valor mais alto naqueles oriundos da linfa auricular. A importância do IM reside no fato de possibilitar a avaliação da resposta terapêutica em menor tempo do que o IB.

Summary

Bacteriologic and morphologic index for diagnosis during the treatment in leprosy patients

The study of the bacterial and morphological index from the nasal mucus and the cutaneous lymph from leprosy patients has shown that the cutaneous lymph from ear lobes presented a higher positivity than the one from elbows, and that the nasal mucus presented the lowest positivity. This study showed further the importance of the morphological index in assessing the therapeutical response in shorter time than the bacterial index.

Introdução

Ridley & Jopling (9), sugeriram uma classificação para a hanseníase cujos parâmetros inclui a observação das diferentes formas bacterianas e os seus respectivos números nos esfregaços e cortes histológicos.

Atualmente considera-se indispensável na classificação das formas contagiantes da hanseníase a utilização do índice bacteriológico (IB) (10), que expressa quantitativamente a carga bacilar. Do mesmo modo a avaliação da terapêutica torna-se mais sensível aplicando-se o índice morfológico (IM) (11) que expressa o número de bacilos nas formas sólida, fragmentada e granulosa no curso do tratamento. Muitos outros trabalhos vêm sendo realizados para comparar características morfológicas com viabilidade (1, 3, 6, 8) e, é aceito por alguns pesquisadores que os bacilos estão inviáveis (fragmentado e granuloso) se após a coloração com carbo-fucsina, eles apresentarem uma coloração "não sólida". Todavia o índice morfológico não é rotineiramente utilizado pela dificuldade técnica e pela discordância sobre a sua importância.

* Trabalho realizado no Setor de Hanseníase/FIOCRUZ. Auxílio financeiro da Comissão Evangélica de Reabilitação de Pacientes Hansenianos (CERPHA).

A verificação da presença de maior quantidade de bacilos em áreas mais frias do corpo, vêm recomendando, além da coleta de material do muco nasal, a coleta de material dos lóbulos auriculares e cotovelos. Mais recentemente outros autores vêm propondo a feitura de esfregaços de material colhido das extremidades dos dedos e artelhos pela evidenciação do alto índice bacteriano, muitas vezes quando em outros locais é negativo (2, 4, 5, 12).

Esse trabalho teve por objetivo verificar o grau de eficácia do índice morfológico no controle terapêutico e avaliar a sensibilidade de vários locais para coleta do material.

Material e Métodos

Seleção de pacientes - Material para os esfregaços foi obtido de 20 pacientes multibacilares virgens de tratamento do Ambulatório Souza Araújo/FIOCRUZ, Rio de Janeiro. Os pacientes foram submetidos a tratamento com esquemas de associação de pelo menos duas das seguintes drogas: rifampicina, sulfona e clofazimina.

Seleção de áreas para coleta de material - Foram estabelecidos cinco locais: muco nasal, lóbulos auriculares direito e esquerdo e cotovelos direito e esquerdo.

Coloração e determinação dos Índices - Cinco esfregaços de cada paciente, colhidos antes do tratamento e após 2 anos de tratamento, foram corados de acordo com a técnica de Ziehl Gabbet. O índice bacteriológico foi feito nos esfregaços dos 20 pacientes enquanto o índice morfológico em esfregaços de 10 pacientes segundo a metodologia proposta por Ridley (10, 11).

Resultados e Discussão

Os índices bacteriológicos dos esfregaços feitos a partir de linfa colhida em cotovelos e lóbulos auriculares (antes do tratamento) são semelhantes. Após o tratamento os lóbulos auriculares apresentam maior positividade; observou-se uma superioridade da linfa em relação ao muco nasal; em 20 esfregaços do muco nasal

Tabela 1 - IB Índice Bacteriológico antes do tratamento (A) e após 2 anos de tratamento (D).

Símbolos: CD = Cotovelo direito; CE = Cotovelo esquerdo; LD = Lóbulo direito; LE = Lóbulo esquerdo

Pacientes	Muco (A)	Muco (D)	CD (A)	CD (D)	CE (A)	CE (D)	LD (A)	LD (D)	LE (A)	LE (D)	
	IB										
A.C.P.	1626	negativo	negativo	2+	negativo	2+	negativo	3+	negativo	4+	negativo
R.C.V.	1676	1+	negativo	3+	negativo	3+	negativo	3+	3+	3+	3+
C.F.	1697	4+	negativo	3+	negativo	3+	negativo	3+	2+	3+	1+
V.E.P.	1673	3+	negativo	2+	negativo	2+	negativo	2+	negativo	3+	negativo
A.M.	1679	negativo	negativo	negativo	1+	3+	2+	2+	1+	3+	1+
E.R.B.	1677	negativo	negativo	3+	negativo	2+	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
A.G.	1662	1+	negativo	4+	1+	2+	1+	3+	2+	3+	3+
A.S.	1686	negativo	negativo	3+	1+	1+	negativo	1-	1+	3+	2+
S.F.A.	1685	negativo	negativo	3+	negativo	3+	negativo	3+	1+	3+	1+
J.D.S.	1675	1+	negativo	1+	1+	1+	negativo	negativo	1+	negativo	negativo
S.B.P.	1698	1+	negativo	3+	negativo	3+	negativo	3+	negativo	3+	negativo
A.D.P.	1629	3+	negativo	3+	2+	3+	1+	4+	3+	3+	2+
L.C.G.L.	1614	2+	3+	2+	negativo	1+	1+	3+	2+	3+	2+
D.F.L.	1624	2+	negativo	3+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	2+
M.H.P.	1638	3+	negativo	3+	negativo	3+	negativo	3+	1+	3+	1+
R.N.B.	1616	1+	negativo	2+	2+	2+	2+	3+	2+	3+	2+
M.H.L.	1632	1+	negativo	2+	negativo	negativo	negativo	2+	negativo	3+	negativo
C.A.V.	1617	2+	negativo	negativo	negativo	1+	2+	4+	2+	3+	2+
J.G.	1625	2+	negativo	2+	1+	3+	2+	3+	2+	3+	3+
M.I.R.	1612	2+	negativo	3+	1+	3+	1+	1+	1+	negativo	2+
Média dos Índices		1,5	0,2	2,4	0,6	2,1	0,7	2,5	1,3	2,6	1,2

Tabela 2 - IM Índice morfológico antes do tratamento (A) e após 2 anos de tratamento (D).

Símbolos: CD = Cotovelo direito; CE = Cotovelo esquerdo; LD = Lobulo direito; LE = Lóbulo esquerdo

Pacientes	Muco (A)	Muco (D)	CD (A)	CD (D)	CE (A)	CE (D)	LD (A)	LD (D)	LE (A)	LE (D)
	IM	IM	DI	IM	IM	IM	IM	IM	EX	IM
S.B.P.	1638	5	negativo	5	negativo	5	negativo	7	negativo	7
A.D.P.	1629	8	negativo	8	5	5	6	5	5	5
L.C.G.L.	1614	3	5	5	negativo	5	5	7	7	negativo
D.F.L.	1624	8	negativo	6	3	5	5	5	6	3
M.H.P.	1638	3	negativo	2	negativo	2	negativo	3	5	5
R.N.B.	1616	0	negativo	7	5	7	3	3	7	5
M.H.L.	1632	0	negativo	2	negativo	negativo	negativo	1	negativo	1
C.A.V.	1617	5	negativo	negativo	negativo	5	5	5	5	5
J.G.	1625	2	negativo	2	5	4	5	5	2	5
M.I.R.	1612	5	negativo	5	5	5	5	5	negativo	5
Média dos índices		3,6	0,5	4,2	2,3	4,5	3,3	4,7	4,0	4,5
										3,3

(a.t.) houve 5 resultados negativos e 6 fracamente positivos enquanto que em 80 esfregaços de linfa (a.t.) 8 foram negativos e 7 fracamente positivos (Tabela 1).

Os índices morfológicos (a.t.) obtidos dos esfregaços realizados com linfa, foram mais altos que os do muco nasal como linfa dos lóbulos auriculares fornecendo valores ligeiramente superiores aos da linfa dos cotovelos. Após o tratamento, os esfregaços do muco nasal foram na maioria negativos para todas as formas bacilares, enquanto os provenientes da linfa, apesar de serem negativos para a forma sólida, foram positivos para as formas "não sólidas" (fragmentado e granuloso) (Tabela 2).

Verificou-se uma variação considerável entre os IB dos pacientes selecionados, podendo ser justificado por termos incluídos todos os multibacilares. O índice morfológico embora variando de paciente para paciente, mostrou-se quase sempre positivo após o tratamento, sendo mais sensível na linfa do que no muco.

Ao tentar estabelecer locais confiáveis para a avaliação da eficácia terapêutica, leva-se em conta a carga bacilar persistente ao longo do tratamento. Nesse trabalho, confirmamos resultados apresentados por pesquisadores (2, 5) que citam os lóbulos auriculares como de grande valia para o controle terapêutico.

A despeito do que referem outros autores, podemos avaliar a importância do índice morfológico sobre o bacteriológico na rotina, verificando-se que embora a carga bacilar diminua com o decorrer do tratamento, exige um tempo mais prolongado. Por outro lado, o índice morfológico pela quantificação da forma sólida em relação as outras, possibilita estabelecer, em menor tempo a atuação real do medicamento sobre o bacilo. Através da persistência da forma "viável" no descurso do tratamento é possível colocar sob suspeita os pacientes resistentes.

Trabalhos envolvendo maior número de casos assim como a utilização da classificação de Ridley & Jopling poderão indicar mais íntima correlação dos índices com as formas clínicas pré e pós tratamento.

Referências Bibliográficas

1. Hansen, G.A. & Loofit, C. - Leprosy in its clinical and pathological aspects. Bristol, Wright, 1985.
2. Hiramalini, S., Joseph, N.A. & Chako, C.J.G. - Concentration and persistence of bacilli in the fingers and toes of patients with lepromatous leprosy. Lepr. Rev., 49:223-229, 1978.
3. Hoffman, W.M. - The granular forms of the leprosy bacillus. Int. J. Lepr., 1:149-158, 1933.
4. Jopling, W.H.; Rees, R.J.W. & Ridley, D.S. - The fingers as sites of leprosy bacilli in pre-relapse patients. Lepr. Rev., 50:289-292, 1979.

5. Kaur, S.; Kumar, B. & Darshan, H. - Choice of sites for study of slit skin smears. *Lepr. Rev.*, 52:27-33, 1981.
6. Mc Rae, D.H. & Shepard, C. - Relationship between the staining quality of *M. leprae* and infectivity for mice. *Infect. Immun.*, 3:116-120, 1971.
7. OSM - Manual para controle da Hanseníase, 1983.
8. Rees, R.J.W. & Valentine, R.C. - The appearance of leprosy bacilli by eight and electron microscopy. *Int. J. Lepr.*, 30:1-9, 1962.
9. Ridley, D.S. & Jopling, W.H. - A classification of leprosy for research purposes. *Lepr. Rev.*, 33:119-128, 1963.
10. Ridley, D.S. - Bacterial indices in leprosy in theory and practice. 2.ed. Bristol, John Wright & Sons, 1964.
11. Ridley, D.S. - The SFG (solid, fragmented granular) index for bacterial morphology. *Lepr. Rev.*, 42:96-97, 1971.
12. Ridley, M.; Jopling, W.H. & Rodley, D.S. - Acid fast bacilli in the fingers of long treated lepromatous patients. *Lepr. Rev.*, 47:93-96, 1976.

VAGINITE POR GARDNERELLA VAGINALIS - PREVALENCIA E AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA PARA SEU DIAGNÓSTICO

Hygia Maria Nunes Guerreiro

Suraia Hagge

João Lycio Conceição Filho

Helenemarie Schaer Barbosa

Deptº de Farmácia Qualitativa

Faculdade de Farmácia UFBA

Campus Universitário de Ondina

40211 Salvador Ba, Brasil

Resumo

Gardnerella vaginalis foi isolada de 48,4% de 97 pacientes estudadas das quais 93,6% apresentavam um quadro de vaginite e/ou cervicite. Para seu isolamento foram utilizados os meios de Ágar Sangue e Ágar Vaginalis, ambos com sangue humano, incubados a 35°C por 72 horas, em lata com vela. A identificação laboratorial foi baseada nos aspectos morfológicos macro e microscópicos, nas características tintoriais e nos testes de fermentação de glicose, maltose e amido usando-se Cystine Trypticase Agar (CTA) como base. O material de 79 pacientes foi submetido a três técnicas diferentes de exame direto: a fresco, Gram e Papanicoloau, encontrando-se uma correlação com os achados de cultivo microbiológico em 36 (81,8%) das 44 culturas positivas. Células típicas do fenômeno Gardner-Dukes, indicativos da presença de *G. vaginalis* foram encontradas em 32 (72,7%) dos exames positivos.

Summary

Gardnerella vaginalis vaginitis - prevalence and methodology evaluation for it's diagnosis

Gardnerella vaginalis was isolated from 48,4% of 97 patients studied, 93,6% of whom had vaginitis and or cervicitis. Both Blood Agar and Vaginalis Agar plates with human blood were used and incubated at 35°C for 72 hours in candle jar. Laboratory identification was based on macro and microscopic morphology, on tintorial characteristics and on CTA glucose, maltose and starch fermentation tests. Discharge from 79 patients were examined by wet mount, Gram and Papanicolau stain, showing a correlation with positive culture in 36 (81,8%) of 44 positive isolates. Clue cells or Gardner-Dukes phenomenon were seen in 32 (72,7%) of 44 positive cultures.

Introdução

Gardnerella vaginalis (*Haemophilus vaginalis*) teve seu nome proposto por Greenwood e Pickett (8) em 1980, baseados nos resultados de seus estudos taxonômicos.

Sua patogenia e identificação laboratorial tem sido amplamente discutida nos últimos anos (5, 10, 16, 18).

G. vaginalis tem sido comumente associada a vaginite inespecífica (1, 15), incluída entre os agentes de doença sexualmente transmissível (5), mas incluída também entre os habitantes normais da vagina humana (1, 13).

O diagnóstico laboratorial de *G. vaginalis*, muitas vezes prejudicado pela ausência de meios de cultura que otimizem seu isolamento, tem originado pesquisas várias na busca de métodos diagnósticos adequados (3, 5, 18).

A presente investigação pretende ser uma contribuição ao diagnóstico laboratorial de *G. vaginalis*, numa tentativa de estabelecimento de método diagnóstico simplificado e de baixo custo, adaptado à nossa realidade.

Material e Métodos

A população estudada constitui-se de 97 mulheres sexualmente ativas, com ou sem queixa clínica, na faixa etária entre 19 e 50 anos, sendo a idade média 33 anos, de nível sócio-ecocômico baixo em sua grande maioria e que procuraram o ambulatório do Centro de Pesquisas da Maternidade Clímério de Oliveira da Universidade Federal da Bahia. A colheita de material ocorreu no período de maio a setembro de 1983.

O material colhido de cervix uterino, vagina e uretra era semeado no meio de cultura Agar Vaginalis (VA), descrito por Greenwood & Pickett (7) e Agar Sangue (AS), com sangue humano, sendo também colhido material para exame direto: a fresco e corado pelos métodos de Gram e Papanicolau.

Os achados dos exames a fresco, Gram, Papanicolau e cultura foram considerados isoladamente, sem prévio conhecimento dos demais.

Estamos designando neste trabalho como fenômeno Gardner-Dukes, ou fenômeno G-D, de acordo com a sugestão de Dunkelberg (4), células epiteliais recobertas de bacilos sugestivos de *G. vaginalis*, localizados principalmente na sua periferia, dificultando a visualização nítida do contorno celular (2).

Foram considerados como aspectos diagnósticos a presença do fenômeno G-D em qualquer das técnicas de exame direto. Ao exame de Gram além do fenômeno G-D foram também considerados a presença de bacilos delicados, pleomórficos, Gram lábeis, Gram negativos com granulações Gram positivas ou cocobacilos Gram negativos.

As placas de VA e AS eram incubadas a 35°C em ambiente de umidade e CO₂, pela técnica da lata com vela, sendo observadas com 48 e 72 horas.

Consideravam-se suspeitas as colônias pequenas, produtoras de hemólise difusa e cujo Gram demonstrava a presença de bacilos conforme anteriormente descritos. Das colônias suspeitas eram realizados testes de catalase e oxidase, além de repique para verificação de pureza da amostra e realização de testes de fermentação da glicose, maltose e amido, utilizando-se como meio base Cystine Trypticase Agar (Difco). No caso do amido a solução do carboidrato era feita a frio e adicionada ao meio base fundido e levemente resfriado, anterior à distribuição em tubos e autoclavagem. O meio pronto era sempre utilizado no prazo de poucas semanas. A leitura dos carboidratos era feita até 72 horas.

Resultados

G. vaginalis foi isolada de 47 pacientes que correspondem a 48,4% da amostra. Destas pacientes, 44 (93,6%) apresentavam um quadro de vaginite e/ou cervicite, conforme diagnóstico pelo método Papanicolau. A flora microbiana destas pacientes, (dados ainda não publicados), teve *G. vaginalis* como o patógeno mais frequentemente isolado, enquanto *Trichomonas vaginalis*, *Candida albicans* e *Neisseria gonorrhoeae* foram encontrados em 10,3, 7,2 e 1,0% da população respectivamente.

A Tabela 1 relaciona o isolamento de *G. vaginalis* isoladamente ou associada a outros patógenos reconhecidos e a ocorrência de vaginite.

Em 38 (80,9%) dos casos positivos, a *G. vaginalis* foi isolada como único patógeno, enquanto que em 9 (19,1%) dos casos positivos *G. vaginalis* esteve associada a *T. vaginalis* e/ou *C. albicans*.

De 35 (79,5%) das pacientes com vaginite, *G. vaginalis* foi isolado como único patógeno em potencial.

De 79 pacientes da amostra, foram realizadas simultaneamente três técnicas diferentes de exame direto: a fresco, Gram e Papanicoloau. Correlacionando o achado dessas técnicas com os da cultura (Tabela 2), verificamos que 36 casos (81,8%) de culturas positivas foram suspeitas por uma ou mais técnicas de exame direto, 8 casos (10,1%) foram de falso-negativos e 14 (17,7%) foram falso-positivos, sendo a percentagem total de acerto 72,2. Houve correlação estatisticamente significativa, $P<0,001$, entre o achado das técnicas de exame direto e o isolamento de *G. vaginalis*.

Analizando-se cada técnica separadamente (Tabela 3), verificamos que os métodos de Gram e a fresco, detectaram o mesmo número de casos positivos: 26 (59,0%), com 18 (22,8%) falso-negativos, sendo que o método de Gram indicou 9 (11,4%) falso-positivos, resultando numa percentagem total de acerto de 65,8%, enquanto o exame a fresco acusou 10 (12,6) falso-positivos, com uma percentagem total de acerto de 64,6%.

O método Papanicoloau identificou 23 (52,3%) casos de culturas positivas sendo 21 (26,6%) falso-negativos e 4 (5,1%) falso-positivos, com uma percentagem total de acerto igual a 68,3%.

Na Tabela 4 consideramos como aspecto diagnóstico apenas a presença de fenômeno G-D, detectado em uma ou mais técnicas de exame direto, excluindo os casos em que *G. vaginalis* achavam-se ausentes, mesmo que houvessem outros indícios da presença dessas células. Este fenômeno esteve presente em 32 (72,7%) dos 44 exames positivos e ausente em 12, correspondendo a 17,7% de falso-negativos. Foram 12 os exames com fenômeno G-D e que deram resultado negativo à cultura, equivalendo a 16,5% de falso-positivos.

Com relação ao local de isolamento de *G. vaginalis* verificamos que em quase 100,0% dos casos em que esta foi isolada na vagina, colônias semelhantes, em quantidade comparável eram também encontradas no cervix e uretra. A confirmação por provas bioquímicas dos achados de cervix e uretra só foi feita em alguns casos.

Em três casos, o isolamento ocorreu apenas no cervix e em um único caso só na uretra.

Discussão

G. vaginalis foi o patógeno mais frequentemente isolado nesta população. Essa frequência de isolamento de *G. vaginalis* (48,4%) está de acordo com outros pesquisadores como Golberg & col. (6) que encontraram uma taxa de isolamento de 22,3%, Palhano Júnior & col. (14) com 32,7%, Mendel & col. (13) com 51,0% e Amsel & col. (1) com 51,3%. Percentuais de isolamento mais elevados como os conseguidos por Ison (3) com 74,0% e Pheifer & col. (15) com 94,0%, podem ser explicados pelo tipo de população investigada, que se constituiu exclusivamente de pacientes com vaginite inespecífica, da qual nenhum outro patógeno foi isolado.

Tabela 1 - Isolamento de *Gardnerella vaginalis* como patógeno em potencial único ou associado a *Trichomonas vaginalis* e/ou *Candida albicans* e relação com presença ou ausência de vaginite

Achado microbiológico	Processo inflamatório					
	Vaginite Nº	Vaginite %	Ausência de vaginite Nº	Ausência de vaginite %	Total Nº	Total %
<i>G. vaginalis</i>	35	79,5	3	100,0	38	80,9
<i>G. vaginalis</i>						
<i>T. vaginalis</i> e/ou	9	20,5	0	0,0	9	19,1
<i>C. albicans</i>						
Total	44	93,6	3	6,4	47	100,0

Tabela 2 - Correlação do isolamento de *Gardnerella vaginalis* e suspeita diagnóstica por técnicas de exame direto realizadas em 79 pacientes da amostra. ($\chi^2 = 14,6$, $P<0,001$)

Exame direto	Resultados de Cultura					
	Cultura positiva		Cultura negativa		Total Nº	Total %
	Nº	%	Nº	%		
Positivo	36	81,8	14	40,0	49	62,0
Negativo	8	18,2	21	60,0	30	38,0
Total	44	100,0	35	100,0	79	100,0

Acreditamos que a percentagem por nós encontrada, dentre as mais altas daqueles que trabalharam com população não selecionada, deveu-se em parte à elevada percentagem de pacientes com processo inflamatório típico (85,6%). A nosso ver deveu-se também à utilização de um meio de cultura adequado como o Ágar Vaginalis que facilita o isolamento e reconhecimento da *G. vaginalis*. Além disso o prolongamento do período de incubação até 72 horas por nós utilizado, ao invés das 48 horas preconizadas por Greenwood & Pickett (7), melhorava ainda mais o reconhecimento, aumentando o tamanho colonial e a nitidez da hemólise. Já o crescimento em Ágar Sangue embora ocorresse, era de colônias diminutas, de difícil visualização e isolamento, mesmo com 72 horas de incubação.

O não isolamento de *G. vaginalis* em estudos de microflora vaginal como o de Hamman (9) ou uma percentagem bem pequena de isolamento, 2,9 a 5,8% como o relatado por Zunin & col. (20), poderia ser explicado pela não inclusão nesses estudos de um meio de cultura específico para *G. vaginalis*. Relatos de um percentual de isolamento mais baixo como o de Rocha & col. (17) em que mais de um meio de isolamento específico de *G. vaginalis* foi utilizado não podem ser facilmente explicados, não podemos entretanto esquecer a possível interferência nos resultados de prevalência, de fatores como a raça, a promiscuidade sexual (5), a idade, a situação sócio-econômica (12) e o uso de contraceptivo oral.

Ao avaliarmos a importância das diferentes técnicas de exame direto utilizadas, no diagnóstico presuntivo de *G. vaginalis*, embora tenha havido pouca diferença, a técnica de Papanicoloau apresentou a menor percentagem de erro, 30,4%, devido principalmente ao número reduzido de falso-positivos.

Com relação ao fenômeno G-D isoladamente, em nosso estudo, a percentagem de correlação de encontro deste com uma cultura positiva foi de 72,7%. Essa relação tem variado em diferentes investigações. Levinson (11) encontrou essa relação em 23,5% da população estudada, com 25,0% de falso-positivos. Smith (18) relata o fenômeno G-D em 25,0% de falso-positivos. Amsel (1) encontrou uma relação de 38,0%, enquanto Smith (19) em outro artigo, relata 44,0% de correlação, sendo 27,0% falso-positivos; a percentagem total de erro relatada por Smith foi de 36,5%. Esses números demonstram que embora o fenômeno G-D seja frequentemente encontrado em pacientes com culturas positivas para *G. vaginalis*, podem também estar ausentes em pacientes com culturas positivas ou presentes em casos de culturas negativas.

Muitos são os fatores que interferem na variação da percentagem de correlação do

Tabela 3 - Correlação do isolamento de *Gardnerella vaginalis* com os achados das três diferentes técnicas de exame direto a fresco, Gram e Papanicoloau realizadas em 79 pacientes

Técnica de exame direto	Resultado da cultura			
	Cultura positiva	Cultura negativa	%	%
	Nº	%	Nº	%
A fresco	3	6,8	5	14,3
Gram	6	13,8	3	8,6
Papanicoloau	1	2,3	0	0,0
A fresco e Gram	4	9,1	2	5,7
Gram e Papanicoloau	3	6,8	1	2,8
A fresco e Papanicoloau	6	13,6	0	0,0
A fresco Gram e Papanicoloau	13	29,5	3	8,6
Nenhuma das técnicas	8	18,2	21	60,0
Total	44	100,0	35	100,0

Tabela 4 - Correlação do isolamento de *Gardnerella vaginalis* com o achado de fenômeno Gardner-Dukes pelas três técnicas diferentes de exame direto realizadas em 79 pacientes

Técnica de exame direto	Resultado da cultura			
	Cultura positiva	Cultura negativa	%	%
	Nº	%	Nº	%
A fresco	3	6,8	6	17,1
Gram	2	4,5	2	5,7
Papanicoloau	3	6,8	0	0,0
A fresco e Gram	4	9,1	1	2,8
Gram e Papanicoloau	1	2,3	1	2,8
A fresco e Papanicoloau	8	18,2	0	0,0
A fresco Gram e Papanicoloau	11	25,0	3	8,6
Nenhuma das técnicas	12	27,3	22	62,9
Total	44	100,0	35	100,0

exame direto e da cultura positiva: presença da bactéria no exame em pequena quantidade (1), erro técnico, falta de experiência com o método (19), dificuldade de isolamento de algumas cepas devido a características de anaerobiose e/ou a natureza fastidiosa do organismo (10, 18), tem sido apontados por alguns autores, com os quais concordamos.

Na casuística por nós estudada, os três casos em que as técnicas de exame direto eram simultaneamente sugestivas da presença de *G. vaginalis* e que tiveram resultado negativo à cultura, é interessante ressaltar que das três amostras em questão, foi isolada uma bactéria, cujas características coloniais e morfotintoriais eram semelhantes à *G. vaginalis*, mas cujos resultados do teste de amido, um dos critérios utilizados na identificação da mesma, foram negativos. Não foi possível repetir o teste para confirmação do resultado devido à perda de viabilidade das amostras.

Pelos nossos dados acreditamos que *G. vaginalis* seja um importante agente de vaginite para a população de baixa renda por nós estudada e mesmo sem os dados para a população geral na cidade de Salvador, achamos importante incentivar os laboratórios clínicos a usar as três técnicas de exame direto: a fresco, Gram e Papanicoloau para o diagnóstico de *G. vaginalis*, em substituição a uma única lâmina corada pela técnica de Papanicoloau, frequentemente utilizada pelos laboratórios em nosso meio, onde a situação sócio-econômica precária obriga a um drástico corte no custo dos exames laboratoriais. O uso concomitante destas três técnicas de exame direto onera muito pouco o diagnóstico e aumenta em muito a sua eficiência. Na nossa amostra houve uma elevação de 52,3% para 81,8% dos casos suspeitos em exame direto e confirmado pela cultura, quando do emprego das três técnicas simultaneamente, em comparação com o uso exclusivo da técnica de Papanicoloau. A percentagem total de erro foi inferior a 30,0%.

Para que a eficiência diagnóstica aumente, acreditamos necessário um programa de treinamento técnico que atinja os vários laboratórios clínicos, para que esses aumentem sua eficiência no reconhecimento de *G. vaginalis* e do fenômeno G-D, tanto no exame a fresco, como no corado pelos métodos de Gram e Papanicoloau.

Sempre que a cultura for possível, o meio de Ágar Vaginalis substitui com vantagem o meio de Ágar Sangue, que junto com o meio de Thayer Martin constituiriam o esquema ideal de cultivo de secreção cervical e vaginal.

Agradecimentos

Os autores expressam sua gratidão ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) que financiou este projeto; assim como à Maternidade Clímério de Oliveira, na pessoa da Drª Indira Chaves, que gentilmente cedeu suas pacientes.

Referências Bibliográficas

1. Amsel, R.; Totten, P.A.; Spiegel, C.A.; Chen, K.C.S.; Eschenbach, D. & Holmes, K.K. - Nonspecific vaginitis. Am. J. Med., 74:14-22, 1983.
2. Blackwell, A. & Barlow, D. - Clinic diagnosis of anaerobic vaginosis (non-specific vaginitis). Br. J. Vener. Dis. 58:387-392, 1982.
3. Ison, C.A.; Dawson, S.G.; Hilton, J.; Csonka, G.W. & Easton, C.S.F. - Comparison of culture and microscopy in the diagnosis of *Gardnerella vaginalis* infection. J. Clin. Pathol., 35:550-554, 1982.
4. Dunkelberg, Jr., W.E. & Woolvin, S.C. - *Haemophilus vaginalis* relative to gonorrhea and male urethritis. Mil. Med., 128:1098-1101, 1963.
5. Gardner, H.L. - *Haemophilus vaginalis* vaginitis after twenty-five years. Am. J. Obstet. Gynecol., 137:385-391, 1980.
6. Golberg, R.L. & Washington II, J.A. - Comparison of isolation of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginalis*) from Peptone - Starch - Dextrose Agar and Columbia Colistin - Nalidixic Acid Agar. J. Clin. Microbiol., 4:245-247, 1976.

7. Greenwood, J.R., Pickett, M.J.; Martin, W.J. & Mack, E.G. - *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginalis*): method for isolation and rapid biochemical identification. *Health Lab. Sci.*, 14:102-106, 1977.
8. Greenwood, J.R. & Pickett, M.J. - Salient Features of *Haemophilus vaginalis*. *J. Clin. Microb.*, 9:200-204, 1979.
9. Hammann, R. - A reassessment of the microbial flora of the female genital tract, with special reference to the occurrence of *Bacteroides* species. *J. Med. Microbiol.*, 15:293-302, 1982.
10. Jones, B.M. - *Gardnerella vaginalis* associated vaginitis. *Med. Lab. Sci.*, 40:53-57, 1983.
11. Levinson, M.E.; Trestman, I.; Quach, R.; Sladowski, C. & Floro, C.N. - Quantitative bacteriology of the vaginal flora in vaginitis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 133:139-144, 1979.
12. Martins, J.A.P. & Neme, B - Flora bacteriana cérvico-vaginal - I Composição. *Ginec. Obstet. Bras.*, 5:71-77, 1982.
13. Mendel, E.B. & Haberman, S. - The vaginal ecology and its relationship to symptoms in vaginitis. *South Med. J.*, 58:374-378, 1965.
14. Palhano Júnior, L.; Souza, H.A. & Prest, A.C. - *Gardnerella* (*Haemophilus*) *vaginalis* e sua importância na clínica ginecológica. *Rev. Bras. Anál. Clin.*, 14:7-12, 1983.
15. Pheifer, T.A.; Forsyth, P.S.; Durfee, M.A.; Pollock, H.M. & Holmes, K.K. - Nonspecific vaginitis, *New Engl. J. Med.*, 298:1429-1433, 1978.
16. Reilly, S. & Human, R.P. - *Gardnerella vaginalis*: pathogen or commensal. *Lancet.*, 2:111, 1983.
17. Rocha, D.T.S.; Formiga, L.C.D.; Villela, L.H.C. & Marques, E.A. - Ocorrência, identificação e preservação de *Gardnerella vaginalis*. 12º Congresso Brasileiro e 9º Congresso Latino-Americano de Microbiologia: programa-resumos, p.102, 1983.
18. Smith, R.F.: New medium for isolation of *Corynebacterium vaginalis* from genital specimens. *Health Lab. Sci.*, 12:219-224, 1975.
19. Smith, R.F.; Rodgers, H.A.; Hines, P.A. & Ray, P.M. - Comparisons between direct microscopy and cultural methods for recognition of *Corynebacterium vaginalis* in women with vaginitis. *J. Clin. Microb.*, 5:268-272, 1977.
20. Zunin, A.; Martinetto, P.; Achino, A. & Viviani, P. - Studio della flora batterica vaginale in condizioni normali e in quadri patologici di frequente riscontro ginecologico. *Giorn. Batt. Virol. Immun.*, 74:320-334, 1981.

SOBREVIVÊNCIA DE YERSINIA ENTEROCOLITICA EM DIVERSOS SISTEMAS AQUÁTICOS EXPERIMENTAIS

Angela Côrrea de Freitas
 Marly Paiva Nunes
 & Ilvan Delgado Ricciardi

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

Resumo

Amostras de *Yersinia enterocolitica* foram capazes de sobreviver em diversas coleções aquáticas por períodos de até 30 dias. Os resultados destes experimentos, realizados "in vitro", sugerem que redutos aquáticos possam atuar na perpetuação de *Yersinia enterocolitica* em ambientes naturais, além de servir como fonte de infecção para humanos e animais.

Summary

Survival of Yersinia enterocolitica in different experimental aquatic systems

Strains of *Yersinia enterocolitica* were able to survive in different aquatic collections for up to 30 days. The results of these experiments, performed "in vitro", suggest that water resources could act in the perpetuation of *Yersinia enterocolitica* in natural environments, besides serving as source of infection for human and animals.

Introdução

Diversos estudos têm demonstrado que infecções humanas causadas por *Yersinia enterocolitica*, são essencialmente transmitidas pelo consumo de alimentos de origem animal (carne, leite, ostras), vegetal e de água. Dessas variáveis, o ambiente aquático tem mostrado um relevante papel na epidemiologia dessas infecções, em virtude de abrigar espécies de *Yersinia*. A possibilidade dos ambientes aquáticos servirem de reservatórios desses microorganismos e, por conseguinte, de permitirem a sobrevivência dos mesmos nesses "habitats", assume em seu aspecto epidemiológico, considerável importância (3, 7, 8, 10, 11).

O presente estudo teve por objetivo determinar a capacidade de sobrevivência de amostras de *Y. enterocolitica*, de origem humana e ambiental, em sistemas aquáticos experimentais, visando avaliar a potencialidade dos reservatórios aquáticos, como fonte de infecção ou perpetuação da espécie, no biocírculo das águas.

Material e Métodos

Amostras de *Yersinia enterocolitica* ensaiadas - *Y. enterocolitica* sorotipo 0:5, Instituto Pasteur (IP) amostras 124 (Amostra Padrão); *Y. enterocolitica* sorotipo 0:5, isolada de água de rio poluído; *Y. enterocolitica* sorotipo 0:16 (biotipo 2),

isolada de água de estuário poluído; *Y. enterocolitica* sorotipo 0:10 [K₁] isolada de água de córrego limpo.

Sistemas aquáticos de sobrevivência - Água do mar limpa, colhida na Barra da Tijuca (RJ); água de córrego limpo, procedente da Floresta Nacional da Tijuca (RJ); água de estuário poluído, colhida na Ilha do Fundão (RJ); água de rio poluído, colhida no Alto da Boa Vista (RJ); controle para crescimento endógeno em salina tamponada (PBS) pH 7,4 e 0,15M; controle de sobrevivência na salinidade marinha, em NaCl 3,5%.

As amostras de água foram coletadas em frascos esterilizados, presos pelo gargalo por um barbante de cerca de um metro, sendo transportadas ao laboratório em banho de gelo. As amostras foram passadas através de filtros de papel e filtros esterilizantes Seitz, sendo mantidas sob refrigeração até o momento da execução da experiência. Foram feitos testes de esterilidade após as filtragens, em caldo infuso de cérebro e coração (BHI-Merck).

Preparo do inóculo - As amostras de *Y. enterocolitica* foram cultivadas em 5ml de caldo BHI durante 24 horas a 25°C.

As culturas resultantes foram centrifugadas a 12.100g por 20 minutos, lavadas duas vezes com salina tamponada esterilizada e padronizadas para 130 U.K., com filtro verde (540μm) em fotocolorímetro Klett Summerson, de modo a se obter suspensões com densidade em torno de 10^5 unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro.

Os cálculos das UFC foram obtidos através de contagens realizadas em placas contendo BHI adicionando de 2% de ágar, a partir de diluições da suspensão bacteriana.

Testes de sobrevivência - As experiências de sobrevivência foram montadas distribuindo-se separadamente, em tubos esterilizados, aliquotas de 8ml dos seis sistemas aquáticos. A cada sistema foi adicionado 2ml da diluição 10^{-3} de cada suspensão de *Y. enterocolitica*. Os tubos contendo essa mistura foram incubados a 25°C. Foram feitas contagens de células viáveis através de plaqueamento em BHI adicionando de 2% de ágar, em duplicata, a partir dos sistemas e/ou das diluições 10^{-1} até 10^{-4} , no tempo zero (momento da adição da suspensão bacteriana ao sistema) e, em intervalos de 24 horas, durante treze dias consecutivos e, finalmente, no trigésimo dia de incubação.

As placas, após semeadura, foram incubadas a 25°C por 48 horas. Foram contados os números de colônias e realizados os cálculos do número de amostras de *Y. enterocolitica* sobreviventes. Os controles de pureza das colônias de *Y. enterocolitica* foram obtidos por meio de provas bioquímicas presuntivas (13, 14).

Resultados

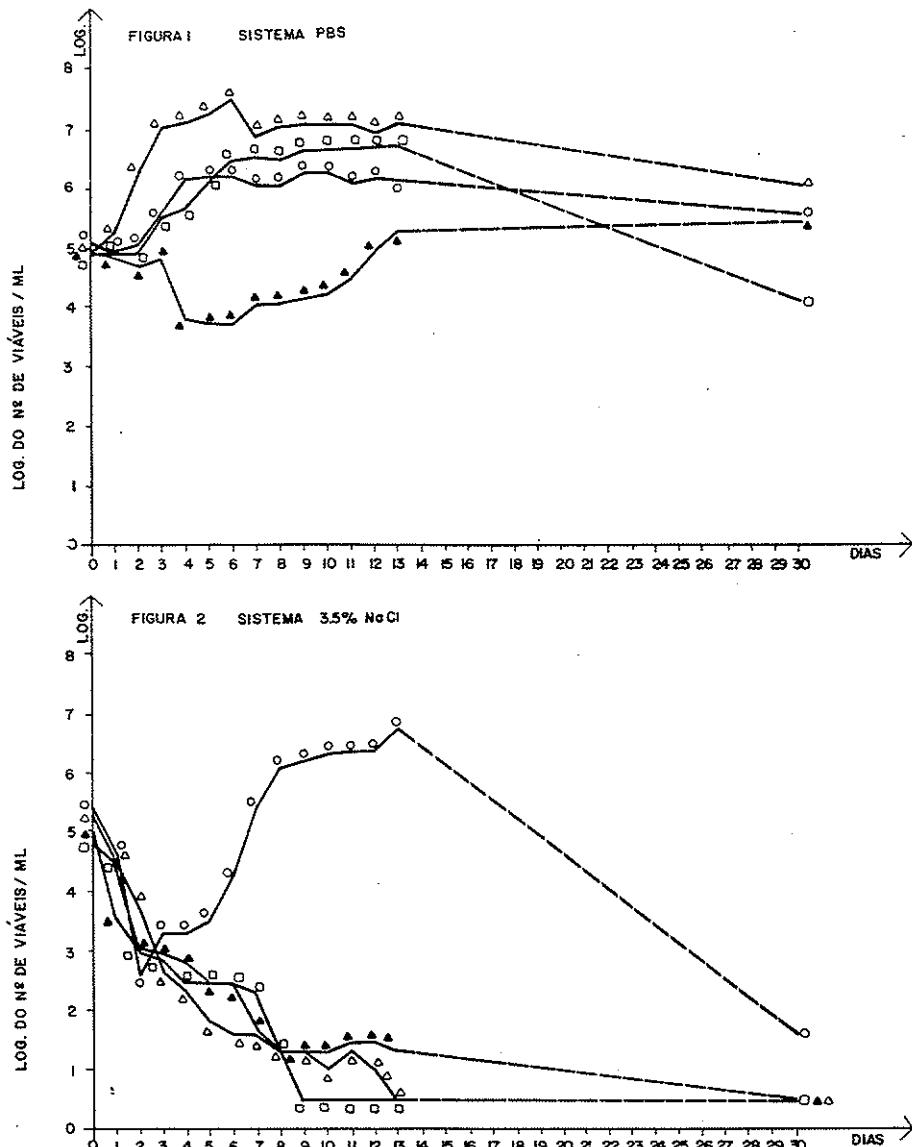
As Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 mostram as curvas de sobrevivência e/ou crescimento de cada uma das amostras de *Y. enterocolitica* testadas. O controle em salina tamponada (Figura 1) assegurou a manutenção das amostras durante os trinta dias estudados. No controle a 3,5% de cloreto de sódio (Figura 2) foi observado um declínio acentuado, e progressivo, do número de células viáveis desde as primeiras 24 horas, estendendo-se durante todo o período da experiência, até a impossibilidade de detecção de células viáveis. Um comportamento diferenciado foi notado para a amostra de *Y. enterocolitica* sorotipo 0:5, isolada de rio poluído, que após uma queda nas contagens de viáveis, foi capaz de sustentar um crescimento exponencial, até o décimo terceiro dia de incubação. Transcorrido esse período detectou-se a quase perda da viabilidade da amostra.

Os sistemas de água doce (córrego e rio) permitiram a sobrevivência das amostras de *Y. enterocolitica* durante todo o experimento realizado (Figuras 3 e 4).

O comportamento observado para as quatro amostras de *Y. enterocolitica* nas águas de estuário poluído (Figura 5), foi tipicamente de crescimento, durante os treze dias iniciais de incubação observando-se, ao final do experimento, contagens próximas ao inóculo inicial.

Figura 1 e 2 - Sobrevivência em salina tamponada (PBS pH 7,4) e em solução de 3,5% de NaCl.

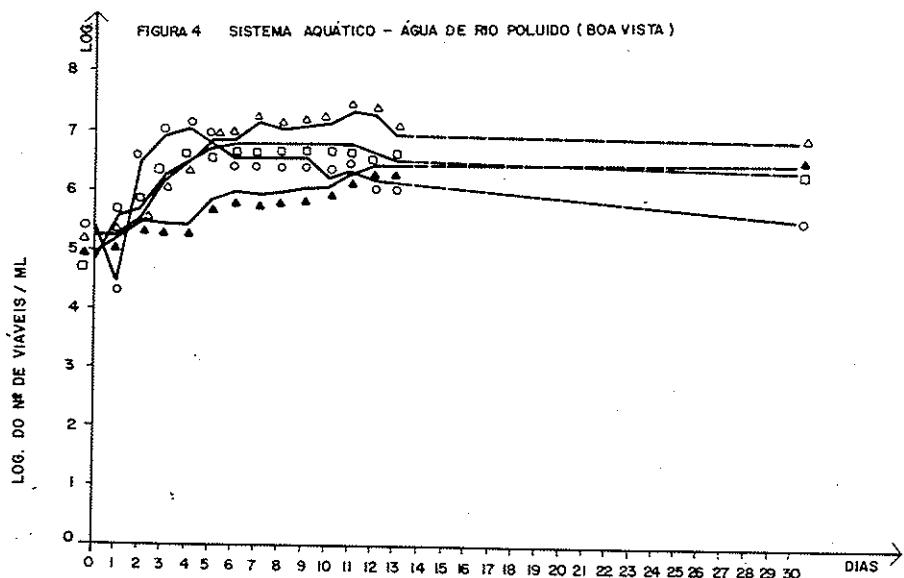
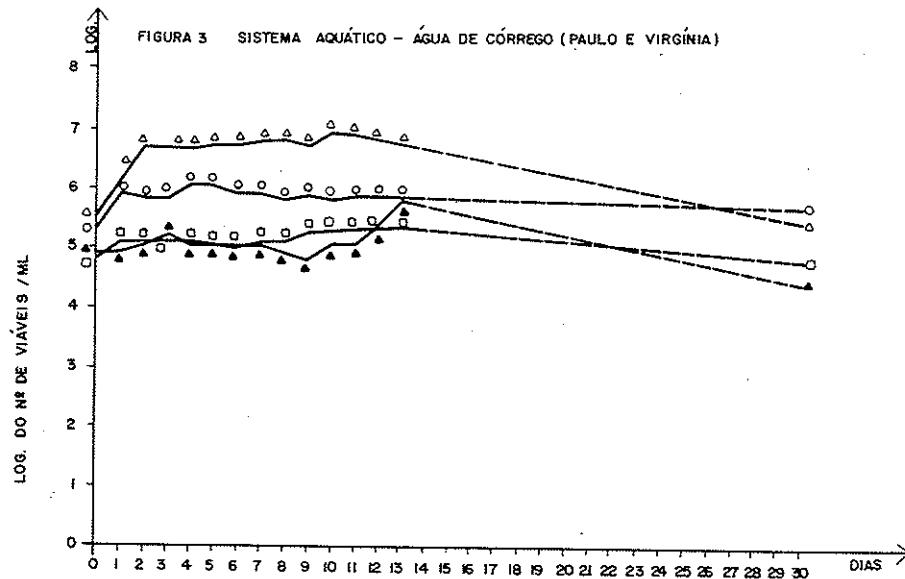
Símbolos: (Δ) = Amostra padrão de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:5 Instituto Pasteur (IP) 124; (O) = Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:5 isolada de água de rio poluído; (\blacktriangle) = Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:6 isolada de água de estuário poluído; (\square) = Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:10 [K₁] isolada de água de córrego limpo.



Em águas marinhas, apenas a amostra pertencente ao sorotipo 0:10 [K₁] apresentou um declínio acentuado, após um crescimento efetivo até o oitavo dia de incubação, culminando com a ausência de contagens de viáveis no término do período ensaiado. As demais amostras foram capazes de sobreviver por todo o período estudado (Figura 6).

Figura 3 e 4 - Sobrevivência em água de córrego limpo e em água de rio poluído.

Símbolos: (Δ) = Amostra padrão de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:5 Instituto Pasteur (IP) 124; (O) = Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:5 isolada de água de rio poluído; (\blacktriangle) = Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:16 isolada de estuário poluído; (\square) = Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:10 [K_1] isolada de água de córrego limpo.



Discussão

A presente investigação avaliou o papel do ambiente aquático como provável

mantenedor de amostras de *V. enterocolitica* de origem ambiental (4) e humana (amostra padrão IP-124).

O controle em salina tamponada (Figura 1), assegurou a manutenção das amostras durante os trinta dias estudados, sendo este comportamento esperado, em função da salina tamponada ser comumente empregada como meio de enriquecimento para o isolamento de *Versinia* sp. a partir de fezes humanas e animais (2, 6, 15).

O controle a 3,5% de cloreto de sódio (Figura 2), teve por objetivo determinar a capacidade de sobrevivência das amostras em concentrações iônicas compatíveis às encontradas em águas marinhas, associada a uma possível influência desfavorável de uma escassez nutritiva. Este sistema mostrou, como esperado, uma acentuada e progressiva perda da viabilidade entre as amostras estudadas sendo, entretanto, notado um comportamento diferente para a amostra isolada de rio poluído (*V. enterocolitica* sorotipo 0:5) que foi capaz de sobreviver e crescer quando as contagens da população bacteriana caíram em cerca de 50%.

Estudos realizados por Mc Peters & Stuart (11) em águas de rio artificiais, demonstraram resultados superiores das taxas de sobrevivência quando os sistemas foram realizados com água destilada deionizada, ao invés de apenas destilada. Os autores sugeriram que algumas substâncias tóxicas presentes na água destilada foram removidas quando a mesma foi deionizada. No presente trabalho, esta explicação poderia ser discutida, posto que, foi utilizada apenas água destilada para a dissolução do cloreto de sódio a 3,5%. Pode-se ainda comentar que, associada à estas substâncias tóxicas estariam outros fatores, como a diferença de pressão osmótica e a influência adversa da escassez nutritiva na água, vindo a afetar a sobrevivência de microorganismos em sistemas hídricos (5).

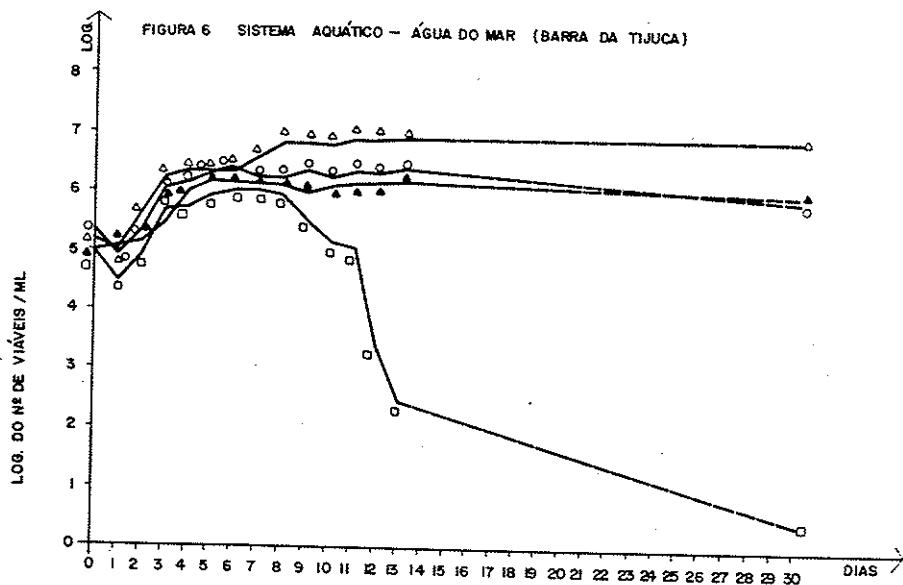
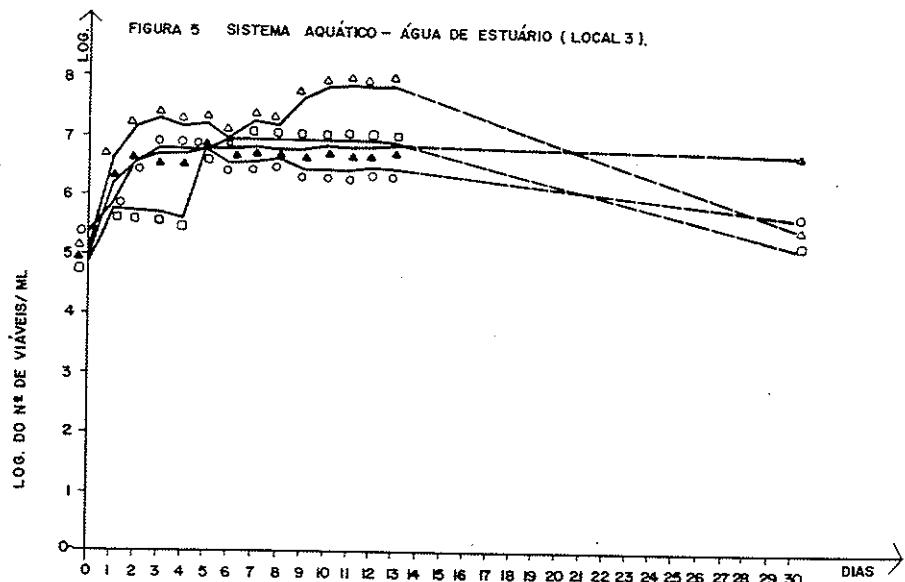
Como relatado anteriormente, uma única amostra foi capaz de sobreviver e crescer no controle a 3,5% de NaCl. Este comportamento poderia ser explicado pela produção, por parte das bactérias viáveis, de enzimas capazes de degradar os detritos celulares das bactérias que sofreram autólise, permitindo assim estender suas sobrevivências sem afetar a viabilidade das mesmas, durante os iniciais treze dias de incubação neste sistema.

As amostras mantidas por 30 dias em água doce (córrego limpo e rio poluído), respectivamente, Figuras 3 e 4, mostraram um crescimento mais efetivo em águas poluídas, denotando-se, as favoráveis condições nutricionais que esta qualidade de água ofereceu ao crescimento das amostras. Resultados semelhantes foram também encontrados por Hendricks (7), o que possibilita sugerir que a presença de matéria orgânica nas águas, originárias de desejos humanos "in natura", tenha contribuído para a determinação do comportamento observado entre as amostras estudadas. A amostra padrão apresentou contagens superiores, em ambos os sistemas, diferindo das demais pela possibilidade da existência de um suprimento endógeno refletindo, provavelmente, o fato de ter sido mantida estocada, por longos períodos, em meios ricos. Cabe ainda comentar que amostras de *V. enterocolitica* de origem ambiental, foram capazes de sobreviver e proliferar em águas destiladas esterilizada, durante 9 dias, tanto a 4, 25 e 37°C (8), o que de certo modo, justificaria os resultados notados, e até esperados entre as amostras mantidas em águas de córrego.

A salinidade marinha, pode influenciar adversamente na sobrevivência de bactérias, devido a um efeito osmótico generalizado ou a uma toxicidade iônica específica (1). A incapacidade de crescimento em águas marinhas e em águas de estuário "in natura" e/ou esterilizada foi observado entre amostras entéricas de origem ambiental e clínica (3, 9), além de outros microorganismos patogênicos (19). Resultados diferentes foram encontrados no presente trabalho, tendo-se evidenciado a viabilidade das amostras de *V. enterocolitica*, em águas de estuário e marinha (Figuras 5 e 6). Alguns autores (1, 6, 9) propuseram que a presença de matéria orgânica no ambiente marinho poderia promover alguma proteção contra o "stress" osmótico, vindo deste modo diminuir os efeitos da salinidade sobre as amostras estudadas. Portanto, tal suprimento nutritivo poderia ter proporcionado a sobrevivência de amostras de *V. enterocolitica* ensaiadas neste trabalho. Estes resultados quando comparados com aqueles de salinidade artificial (3,5% NaCl) vêm validar os efeitos favoráveis atribuídos à presença de matéria orgânica em águas marinhas.

Cabe ainda comentar que os testes de sobrevivência foram realizados "in vitro",

Figura 5 e 6 - Sobrevivência em água de estuário e em água do mar.
 Símbolos: (Δ) = Amostra padrão de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:5 Instituto Pasteur (IP) 124; (O) Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:5 isolada de água de rio poluído; (\blacktriangle) Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:16 isolada de água de estuário poluído; (\square) Amostra de *Yersinia enterocolitica* sorotipo 0:10 [k_1] isolada de água de córrego limpo.



utilizando-se águas filtradas. Assim não foram considerados fatores físico-químicos e biológicos isolados ou inter-relacionados, incluindo-se, aí, a radiação solar, a temperatura, a pressão osmótica, a competição microbiana por nutrientes, a ação de

micro-predadores, a produção de antibióticos ou outras substâncias tóxicas e a presença de bacteriófagos (1, 6), que poderiam afetar, desfavoravelmente, a sobrevivência "in situ" de *Versinia* sp., em ambientes aquáticos.

Diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se considerar que a capacidade observada entre as amostras de *V. enterocolitica* de sobreviver e/ou crescer "in vitro" em ambientes aquáticos assegura a atuação da água como reservatório da espécie, podendo assim, servir como fonte de infecção ou perpetuação desses microorganismos, no biociclo das águas.

Referências Bibliográficas

1. Carlucci, A.F. & Pramer, D. - Factor affecting survival of bacteria in seawater. App. Microbiol., 7:388-392, 1959.
2. Eiss, J. - Selective culturing of *Versinia enterocolitica* at a low temperature. Scand J. Infect. Dis., 7:249-251, 1975.
3. Farage, S.; Freitas, A.C.; Mendonça-Hagler, L.C. & Hagler, A.N. - In vitro survival of enteric bacteria in seawater. Resumos do X Congresso Brasileiro de Microbiologia, Rio de Janeiro, RJ, p.71, 1979.
4. Freitas, A.C. - Estudos ecológicos de *Versinia* sp. em redutos aquáticos naturais, na cidade do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, 1986. (Tese de Mestrado).
5. Greenberg, A.E. - Survival of enteric organism in sea water. Public Health Repts. (U.S.), 71:77-86, 1956.
6. Greenwood, J.R.; Flanigan, S.M.; Pickett, M.J. & Martin, W.J. - Clinical isolation of *Versinia enterocolitica*: Cold temperature enrichment. J. Clin. Microbiol., 2:559-560, 1975.
7. Hendricks, C.W. - Enteric bacterial growth rates in river water. Appl. Microbiol., 24:168-174, 1972.
8. Highsmith, A.K.; Feeley, J.C.; Skaliy, P.; Well, J.G. & Wood, B.T. - Isolation of *Versinia enterocolitica* from well water and growth in distilled water. Appl. Environ. Microbiol., 34:745-750, 1977.
9. Hood, M.A. & Ness, G.E. - Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. App. Environ. Microbiol., 43:578-584, 1982.
10. Jamieson, W.; Madri, P. & Claus, G. - Survival of certain pathogenic microorganism in sea water. Hidrobiologia, 50:117-121, 1976.
11. McFeters, G.A. & Stuart, D.G. - Survival of coliform bacteria in natural waters: field and laboratory studies with membrane - filter chambers. Appl. Microbiol., 24:805-811, 1972.
12. Shehata, T.E. & Marr, A.G. - Effect of nutrient concentration on the growth of *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 107:210-216, 1971.
13. 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.
14. 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.
15. Toma, S. & Deidrick, V.R. - Isolation of *Versinia enterocolitica* from swine. J. Clin. Microbiol., 2:478-481, 1975.

INDICADORES DE CONTAMINAÇÃO FECAL E ENTEROPATÓGENOS EM ÁGUAS DE RECREAÇÃO

Sandro Roberto Valentini
Clarice Queico Fujimura Leite

Deptº de Ciências Biológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
"Campus" de Araraquara
14800 Araraquara SP, Brasil

Maria José Soares Mendes Giannini

Deptº de Análises Clínicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
"Campus" de Araraquara
14800 Araraquara SP, Brasil

& Deise Pasetto Falcão

Deptº de Ciências Biológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
"Campus" de Araraquara
14800 Araraquara SP, Brasil

Resumo

As águas de recreação desempenham importante papel na disseminação de infecções entre seus usuários. Em 108 amostras de águas de recreação (72 de piscinas e 36 de lagos com praias) pesquisaram-se *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *E. coli* enteropatogênica clássica e *E. coli* enteroinvasora; determinou-se o NMP de coliformes fecais e de *E. coli*; realizaram-se contagens de microrganismos heterotróficos e de estreptococos fecais. Não foram isoladas *Shigella*, *Yersinia* e *E. coli* enteroinvasora. Observaram-se reações positivas para todos os outros microrganismos ou grupos de microrganismos, em proporções variáveis. Conclui-se pelo perigo potencial que estas águas representam para os banhistas que as utilizam.

Summary

Indicators microorganisms and enteropathogens in recreational waters

Recreational water can be an important vehicle of infections. A microbiological examination was carried out on 108 samples of recreational water. Seventy-two of them were from swimming pools and 36 were from bathing beaches of inland lakes. The following tests were made: presence or absence of *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, classic enteropathogenic *E. coli* and invasive *E. coli*; verification of the Most Probable Number (MPN) of fecal coliforms and *E. coli*; counts of heterotrophic bacteria and fecal streptococcus. All samples were negative for *Shigella*, *Yersinia* and invasive *E. coli*. For all other microorganisms or groups of microorganisms were observed positive reactions in varying propor-

tions. It was concluded that these waters can be a potential health hazard for their users.

Introdução

As águas de recreação podem estar contaminadas por indivíduos doentes que eliminam nestes locais grande quantidade de microrganismos patogênicos, por animais que podem abrigar patógenos e também por portadores sadios, levando assim a surtos ou casos isolados de infecção (14).

Entre os testes utilizados para avaliar a qualidade bacteriológica de águas de recreação, os mais comuns são aqueles que indicam poluição fecal, como a determinação de coliformes fecais, de *E. coli* e de estreptococos fecais (1, 9). É de grande importância a correlação entre o número de coliformes fecais e de estreptococos fecais no estabelecimento da origem da contaminação fecal, isto é, se humana ou de animal (1).

As águas de recreação não devem conter patógenos intestinais como *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatogênica clássica, *E. coli* enteroinvadora, *E. coli* enterotoxigênica ou *Yersinia enterocolitica*.

Foram realizados alguns estudos sobre águas de piscinas no Brasil, enfocando aspectos diversos (8, 11, 13) e um estudo bastante extenso sobre poluição de praias do litoral paulista (12).

O objetivo da presente pesquisa foi realizar um estudo bacteriológico em diferentes tipos de água doce, de recreação. Em todas as águas foram realizadas as seguintes análises: contagem padrão em placas de microrganismos heterotróficos; contagem de estreptococos fecais; determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais e de *E. coli*; presença de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatogênica clássica, *E. coli* enteroinvadora e de *Yersinia*.

Material e Métodos

1 - Material analisado - 108 amostras de águas de piscinas e de lagos artificiais com praias, assim distribuídas: 72 de piscinas de 6 diferentes clubes, sendo cinco de piscinas com sistema de filtração e tratamento químico e uma piscina com tratamento químico e sem sistema de filtração; 36 amostras de águas de lagos artificiais.

1.1. - Amostragem - De cada um desses locais coletou-se 1 amostra mensal, num total de 12, no período compreendido entre novembro de 1984 a outubro de 1985.

As amostras foram coletadas nas áreas e nos momentos de maior densidade de banhistas, como finais de semana e feriados.

Para águas de piscina com tratamento químico utilizaram-se frascos estéreis contendo tiossulfato de sódio na concentração final de 100mg/l para neutralizar o cloro residual.

As amostras eram coletadas 30cm abaixo da superfície da água e imediatamente transportadas ao laboratório onde eram mantidas refrigeradas até o inicio das análises (período que variou de 2 a 6 horas).

1.2. - Preparo das amostras - Antes de serem analisadas, as amostras eram agitadas vigorosamente para perfeita homogeneização.

Para a contagem padrão em placas, realizavam-se diluições em água destilada tamponada estéril na ordem de 10 (10^{-1} a 10^{-3}).

Para a contagem de estreptococos fecais, foram filtradas através de membranas com poros de 0,45µm e 47mm de diâmetro, quantidades de água suficientes para que as bactérias retidas dessem origem após incubação, a um número entre 30 e 80 colônias por membrana (cerca de 50ml para água de lago e 100ml para água de piscina).

Para pesquisa de *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* enteropatogênica clássica, *E. coli* enteroinvadora e *Yersinia*, foram filtrados 8 litros de água através de membrana filtrante estéril com poros de 0,45mm e diâmetro de 293mm, que a seguir era

fragmentada assepticamente de modo que metade era utilizada na pesquisa de *Shigella*, *E. coli* e *Versinia*, e a outra metade na pesquisa de *Salmonella*.

Na determinação do NMP de coliformes fecais e de *E. coli* utilizaram-se amostras de água não diluidas.

2 - Procedimento dos exames - 2.1. - Contagem padrão em placas de organismos heterotróficos, realizada em duplicata, utilizando-se Ágar Padrão (1) - Semeou-se 1ml de água pura e 1ml das diluições 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} .

2.2. - Contagem de estreptococos fecais (1) - A membrana era transferida para placa contendo o meio de Ágar KF após filtração da água, e incubada a 35°C durante 48 horas. As colônias suspeitas eram contadas e confirmadas através dos testes da catalase, crescimento em Caldo de Cérebro - Coração (BHI) a 45°C e em caldo bileado a 35°C.

2.3. - Determinação do NMP de coliformes fecais e de *E. coli* - Utilizou-se o método dos tubos múltiplos (1) com 3 séries de 5 tubos, semeados com 10, 1 e 0,1ml de água. Para o teste presuntivo utilizou-se caldo lauril triptose e o caldo EC para coliformes fecais. A confirmação de *E. coli* foi realizada por semeadura em Ágar EMB seguida de identificação bioquímica (5).

2.4. - Pesquisa de *Salmonella* - 1/4 da membrana filtrante era homogeneizada em 50ml de Caldo Tetratrationato de Kauffmann e 1/4 em 50ml de Caldo Selenito. Os caldos eram incubados durante 24 horas sendo o Caldo Tetratrationato a 37°C e Caldo Selenito a 42°C.

Utilizaram-se como meios de isolamento o Ágar Verde Brilhante e o Ágar SS.

As colônias suspeitas eram a seguir identificadas bioquímica e sorologicamente (5). A tipagem sorológica completa foi realizada no Instituto Adolfo Lutz de São Paulo.

2.5. - Pesquisa de *Shigella*, *E. coli* enteroinvadora, *E. coli* enteropatogênica clássica e *Versinia* - Metade da membrana filtrante era homogeneizada em 100ml de Água Peptonada a 1% e a mistura incubada a 25°C durante 24 horas. A partir do homogeneizado semeava-se 1 alçada em placa de ágar MacConkey e de ágar SS, que eram incubados a 37°C por 24-48 horas. Esse homogeneizado continuava incubado a 4°C até um máximo de 21 dias para pesquisa de *Versinia*.

Tanto as colônias lactose negativas como as lactose positivas foram submetidas à identificação bioquímica e sorológica para *Shigella* e para *E. coli* enteroinvadora e enteropatogênica clássica (16, 17, 18). Esse mesmo esquema de identificação bioquímica e sorológica utilizado para *E. coli* isolada nessa fase, foi utilizado para as colônias isoladas à partir do Caldo EC.

Para a pesquisa de *Versinia* utilizou-se o homogeneizado da Água Peptonada com o fragmento da membrana, incubado durante 21 dias a 4°C. Semanalmente semeava-se uma alçada em placa de Ágar MacConkey que era incubada a 25°C por 24-48 horas. As colônias suspeitas foram submetidas à identificação bioquímica, sorológica e fagotipagem usuais (2, 7).

Resultados e Discussão

Não foram isoladas *Shigella*, *E. coli* enteroinvadora e *Versinia* em qualquer das amostras examinadas.

Os resultados das contagens de organismos heterotróficos, estreptococos fecais e os NMP de coliformes fecais e de *E. coli* são apresentados na Tabela 1. A Tabela 2 apresenta a amplitude de variação mínima e máxima dos números dessas contagens.

Existe na legislação brasileira uma resolução (4) que classifica as águas de balneabilidade em própria ou imprópria, de acordo com o número de coliformes fecais ou de coliformes totais em um conjunto de 5 amostras de água obtidas no mesmo local em cada uma das 5 semanas anteriores. Como o objetivo desse trabalho era uma verificação mais ampla das condições sanitárias de diferentes águas de recreação,

Tabela 1 - Variação dos números de bactérias heterotróficas, estreptococos fecais, coliformes fecais e *E. coli* em águas de recreação.
 Símbolos: *UFC = Unidades formadoras de colônias.

Natureza da amostra	Nº de amostras examinadas	Bactéria/grupo indicador	Variação do número de bactérias/indicadores													
			<1		1-10		10-10 ²		10 ² -10 ³		10 ³ -10 ⁴		10 ⁴ -10 ⁵			
			Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%		
Água de piscina	72	Heterotróficas (UFC*/ml)	3	4,2	—	—	27	37,5	13	18,1	11	15,3	5	6,9	13	18,1
		Estrep. fecais (UFC*/100ml)	47	65,3	13	18,1	11	15,3	1	1,4	—	—	—	—	—	—
		Colif. fecais (NMP/100ml)	58	80,6	12	16,7	1	1,4	1	1,4	—	—	—	—	—	—
		<i>E. coli</i> (NMP/100ml)	59	81,9	12	16,7	—	—	1	1,4	—	—	—	—	—	—
Áqua de lago	36	Heterotróficas (UFC*/ml)	—	—	—	—	—	—	2	5,6	14	38,9	18	50,0	2	5,6
		Estrep. fecais (UFC*/100ml)	3	8,3	11	30,6	14	38,9	8	22,2	—	—	—	—	—	—
		Colif. fecais (NMP/100ml)	1	2,8	3	8,3	20	55,6	8	22,2	4	11,1	—	—	—	—
		<i>E. coli</i> (NMP/100ml)	3	8,3	10	27,8	13	36,1	8	22,2	2	5,6	—	—	—	—

Tabela 2 - Contagem padrão de heterotróficos e NMP de coliformes fecais e de *Escherichia coli* segundo a amplitude de variação, de amostras de água de recreação.

Símbolos: *UFC = Unidades formadoras de colônias.

Águas	Nº de amostras examinadas	Contagem padrão de heterotróficos			Coliformes fecais			<i>Escherichia coli</i>		
		*UFC/ml		Máximo	NMP/100ml		Máximo	NMP/100ml		Máximo
		Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo		Mínimo	Máximo	
Piscina 1	12	<3,0 x 10	4,4 x 10 ⁵	0	2,0	0	0	0	0	0
Piscina 2	12	0	1,1 x 10 ⁵	0	2,0	0	0	0	2,0	0
Piscina 3	12	<3,0 x 10	>3,0 x 10 ⁵	0	0	0	0	0	0	0
Piscina 4	12	<3,0 x 10	6,3 x 10 ⁵	0	1,7 x 10 ²	0	0	1,7 x 10 ²	0	0
Piscina 5	12	3,1 x 10	1,8 x 10 ⁵	2,0	8,0	0	2,0	8,0	0	2,0
Piscina 6	12	0	>3,0 x 10 ⁵	0	7,0	0	0	7,0	0	2,0
Lago 1	12	3,3 x 10 ²	2,5 x 10 ⁵	0	7,0 x 10	0	0	7,0 x 10	0	2,2 x 10
Lago 2	12	1,6 x 10 ³	6,0 x 10 ⁴	2	≥2,4 x 10 ³	2	2	1,6 x 10 ³	2	1,6 x 10 ³
Lago 3	12	2,0 x 10 ³	1,3 x 10 ⁵	1,3 x 10	≥2,4 x 10 ³	5	5	5,4 x 10 ²	5	5,4 x 10 ²

não foram realizadas as coletas de maneira a poder-se enquadrá-las na classificação acima referida.

Também existe uma legislação do antigo Estado da Guanabara (15) em relação à qualidade bacteriológica de água de piscina que diz: "cada amostra será constituída de 5 porções de 10ml exigindo-se, no mínimo, que 80% de 5 ou mais amostras consecutivas apresentem ausência de germes do grupo coliforme nas 5 porções de 10ml que constitui cada uma delas; a contagem em placas deverá apresentar número inferior a 200 colônias por ml, em 80% de 5 ou mais amostras consecutivas".

Segundo Müller (14) a água de piscina deve ter a qualidade da água potável sob o ponto de vista bacteriológico; isto significa que *E. coli* deve estar ausente em 100ml de água e que na contagem padrão em placas, o número de colônias deve estar abaixo de 100 por mililitro de água. Analisando os resultados da Tabela 1, verifica-se que 18,1% das amostras de águas de piscinas apresentavam *E. coli* em 100ml e que em 58,3% delas as contagens de heterotróficos eram superiores a 100 células por mililitro, tornando-as portanto inadequadas ao uso.

Ainda segundo Müller (14) água de praia para ser considerada como altamente satisfatória deve apresentar contagem de *E. coli* inferior a 100 células por 100 mililitros e para ser considerada como aceitável não deve apresentar *E. coli* em contagem superior a 1.000 células por 100ml de água; das amostras de água, 27,7% possuíam mais de 100 células/100ml e 5,5% apresentavam contagens superiores aquelas que as classificam como água aceitável.

Para piscinas situadas ao ar livre e consequentemente para águas de praia, a

Tabela 3 - Enteropatógenos isolados das 108 amostras de água e sua relação com coliformes fecais e *E. coli*.

Símbolos: AL* = Água de Lago; **AP = Água de Piscina.

Patógeno	Material examinado	Nº da amostra	Número Mais Provável/100ml	
			Coliformes fecais	<i>E. coli</i>
<i>S. juis</i>	AL*	34 L12	49	22
<i>S. oranienburg</i>	AL*	103 Lg	350	350
<i>E. coli</i> 0:26	AL*	16 LIIa	≥2.400	34
<i>E. coli</i> 0:26	AL*	19 LIIa	≥2.400	280
<i>E. coli</i> 0:26	AP**	53 Pla	2	2
<i>E. coli</i> 0:55	AL*	61 L29	33	4
<i>E. coli</i> 0:126	AL*	103 LIIa	350	350
<i>E. coli</i> 0:127	AL*	94 L1a	540	350
<i>E. coli</i> 0:127	AP**	97 L1b	920	540
<i>E. coli</i> 0:127	AL*	24 Pla	2	2
<i>E. coli</i> 0:128	AL*	16 LIIb	≥2.400	34
<i>E. coli</i> 0:128	AL*	28 L1e	920	180
<i>E. coli</i> 0:128	AL*	37 LIIIa	70	70
<i>E. coli</i> 0:128	AL*	100 L14	2	<2
<i>E. coli</i> 0:128	AL*	107 L1d	140	17
<i>E. coli</i> 0:128	AL*	112 L1a	22	22

contagem de coliformes fecais, se constitui no principal indicador de contaminação fecal por animais domésticos, roedores e por materiais trazidos pelas chuvas (1). Segundo estudo realizado por Geldrich & col. (10) as águas de chuva contêm quantidades apreciáveis de coliformes e estreptococos fecais, bem como diferentes sorotipos de *Salmonella*.

Os enteropatógenos isolados nas diferentes amostras de água e sua relação com o NMP de coliformes fecais e *E. coli* são apresentados na Tabela 3.

A Tabela 3 mostra que foram isoladas duas amostras de *Salmonella* de águas de lago. Estes isolamentos ocorreram após enriquecimento, sendo uma cepa isolada a partir do Caldo de Tetratrationato de Kauffmann e outra à partir de Caldo Selenito. Confirma-se mais uma vez a importância do emprego de mais de um meio para enriquecimento de *Salmonella*, fato comprovado anteriormente no isolamento do microrganismo a partir de fezes (6). Os dados relativos ao isolamento de *Salmonella* foram obtidos com a metodologia descrita. Talvez o número de cepas de *Salmonella* isoladas fosse maior se o período de incubação dos caldos de enriquecimento tivesse sido estendido para 5 dias.

Foram isoladas 14 amostras de *E. coli* do grupo enteropatogênica clássica (EPEC). É interessante ressaltar que 12 dessas 14 amostras, foram isoladas a partir de placas de Ágar EMB semeadas com Caldo EC, utilizados na determinação do NMP de coliformes fecais e de *E. coli*; apenas 2 amostras de EPEC foram caracterizadas após filtração da água por membrana filtrante. A maioria das amostras de EPEC (85,7%) foram isoladas de águas de lago sendo apenas 14,3% isoladas de águas de piscina.

Verificou-se também o isolamento a partir de água de lago, de uma cepa de *E. coli* enteroinvasora, através de testes bioquímico e de aglutinação em lâmina e tubo, mas que apresentou teste de Séreny negativo. Esta amostra não foi computada nos resultados gerais, mas será estudada mais detalhadamente para perfeita caracterização.

Analizando-se a Tabela 3, verifica-se que não houve relação em todos os casos, entre a carga de coliformes fecais e *E. coli* com a presença de enteropatógenos. Estes dados confirmam observação de Bonilha (3) quando estudando enteropatógenos isolados de água de irrigação e de alfaces, não observou em todas as amostras, relação entre alta carga de *E. coli* e coliformes fecais com a presença de enteropatógenos. Questiona-se após os dados dos dois trabalhos a importância da determinação de indicadores de contaminação fecal como indicador de presença de enteropatógenos.

Observou-se que as amostras de água da única piscina sem filtro apresentaram as maiores concentrações de microrganismos heterotróficos e fecais.

Conclui-se pelo perigo que essas águas em geral representam para os banhistas que ao fazerem uso delas para fins recreacionais estão sujeitos a contrair infecções intestinais.

Agradecimentos

Trabalho financiado pela FAPESP (proc. 84/1861-5) e CNPq (proc. 40 006/84). Agradecemos à CETESB, Regional de Araraquara pelo auxílio técnico na determinação dos locais de coleta das amostras de água e coleta de algumas delas.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 16.ed. Washington, APHA-AWWA-WPCF, 1985.
2. Beroovier, H.; Brenner, D.J.; Ursing, J.; Steigerwalt, A.G.; Fanning, G.R.; Alonso, J.M.; Carter, G.P. & Mollaret, H.H. - Characterization of *Yersinia enterocolitica* "Sensu stricto". Curr. Microbiol., 4:201-206, 1980.
3. Bonilha, P.R.M. - Microrganismos indicadores de contaminação fecal e enteropatogênicos em hortaliças e suas águas de irrigação. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP. 1986. (Tese de Mestrado).
4. Brasil. Conselho Nacional do Meio Ambiente - Resolução nº 20, de 18 de junho de 1986. Diário Oficial da União-Executivo, Brasília, 30 jul. 1986.
5. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
6. Falcão, D.P. - Estudo bacteriológico de infecções em crianças até 2 anos, no Município de Araraquara, São Paulo. Rev. Microbiol. (São Paulo), 3:127-138, 1972.
7. Falcão, D.P. - *Yersinia enterocolitica*. In: - Trabulsi, L.R., coord. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Ateneu, p.79-89, 1981.
8. Forantine, O.P. - Considerações de ordem sanitárias referentes às principais piscinas existentes em Santa Maria, Rio Grande do Sul. Rev. Fac. Farm. Bioq. Santa Maria, 15:13-24, 1969.
9. Geldreich, E.E. - Applying bacteriological parameters to recreational water quality. J. Am. Wks. Assoc., 62:113-120, 1970.
10. Geldreich, E.E.; Best, L.C.; Kenner, B.A. & Vandonsel, D. - The bacteriological aspects of stormwater pollution. J. Wat. Pollut. Control Fed., 40:1861-1872, 1968.
11. Martini, A.S.; Itiwose, A.M.; Doi, M.L. & Borsato, R.M. - Pesquisa de bactérias e fungos em água de piscinas da cidade de Londrina, PR. Rev. Brasil. Farmácia, jan/março: 34-39, 1982.
12. Martins, M.T. - *Salmonella* no ambiente aquático: significado sanitário. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, USP. (Tese de Doutoramento).
13. Mendonça, C.P. & Ruff, S.D. - Estudo das condições sanitárias das águas de piscinas públicas e particulares, na cidade de Araraquara, SP, Brasil. Rev. Saúde públ., 12:113-121, 1978.
14. Müller, G. - Bacterial indicators and quality criteria for recreational waters. In: - Seminário Internacional sobre indicadores microbiológicos de contaminação, São Paulo, 1978 (conferência proferida).
15. Piscinas de uso coletivo. 2.ed. São Paulo, CETESB, 1975. p.269-275.
16. Trabulsi, L.R. - Colibacilos enteropatogênicos clássicos. In: - Trabulsi, L.R., coord.. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Ateneu, p.51-57, 1981.
17. Trabulsi, L.R. - Colibacilos invasores. In: - Trabulsi, L.R., coord. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Ateneu, p.43-50, 1981.
18. Trabulsi, L.R. - Shigella. In: - Trabulsi, L.R.; coord. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Ateneu, p.59-65, 1981.

AVALIAÇÃO DE TÉCNICAS DE ISOLAMENTO DE YERSINIA ENTEROCOLITICA A PARTIR DE FEZES DE CAMUNDONGOS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE

Deise Pasetto Falcão

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Deptº de Ciências Biológicas
Campus de Araraquara UNESP
14800 Araraquara SP, Brasil

& Mario Tsunezi Shimizu

Faculdade de Odontologia
Deptº de Patologia
Campus de São José dos Campos UNESP
12200 São José dos Campos SP, Brasil

Resumo

Grupos de três camundongos foram inoculados por via intragástrica com quatro cepas de *Yersinia enterocolitica* dos sorotipos 0:3, 0:5 e 0:9; as fezes foram coletadas, periodicamente após a infecção dos animais. Avaliou-se a eficácia da semeadura direta utilizando-se como meios de isolamento o Ágar SS, Ágar MacConkey, "Hektoen Enteric Ágar" e Ágar SS adicionado de 2% de desoxicócolato de sódio; avaliou-se também as técnicas de enriquecimento a frio e empregando o caldo de Rappaport modificado, seguidas de semeadura nos meios de isolamento utilizados para semeadura direta. Nas fezes, os melhores resultados para o isolamento de *Yersinia enterocolitica* dos sorotipos comumente associados com doença no homem, foram obtidos com o enriquecimento a frio durante sete dias seguido de semeadura em Ágar MacConkey. O caldo de Rappaport foi ligeiramente inferior ao enriquecimento a frio e o Ágar SS com 2% de desoxicócolato foi o meio menos eficiente para o isolamento de *Yersinia* de fezes.

Summary

Evaluation of techniques and culture media for isolation of Yersinia enterocolitica from mice's stools experimentaly infected

Groups of three mice were inoculated intragastrically with four strains of *Y. enterocolitica* serotypes 0:3, 0:5 and 0:9. The feces were collected intermittently at 1-7-14-21 and 30 day period after the infection of the animals. The efficiency of direct plating was evaluated using as plating media SS Agar, MacConkey Agar, Hektoen Enteric Agar and SS Agar with addition of 2% of sodium deoxycholate. It was also evaluated the cold enrichment technique and Rappaport's broth, followed by plating on the same media used for direct plating. The best for recovery *Y. enterocolitica* serotypes related to human diseases, from the feces, was the combination of cold enrichment for 7 days followed by plating on Agar MacConkey. The Rappaport's broth was slightly inferior to cold enrichment. SS Agar added of 2% sodium deoxycholate was the plating media less efficient for the isolation of *Y. enterocolitica*.

Introdução

Trabalhos associando *V. enterocolitica* com gastrorenterite aguda têm sido relatados com frequência na Europa, Estados Unidos, Canadá e Japão. A exiguidade de publicações em outras partes do mundo, não é necessariamente devida à ausência de *V. enterocolitica* nessas áreas; o problema pode ser devido à inabilidade para isolar o microrganismo de fezes de pacientes como resultado de inexperiência ou uso inadequado de técnicas apropriadas.

O isolamento de *V. enterocolitica* a partir de cultura pura é relativamente fácil pois cresce bem nos meios usualmente utilizados para enterobactérias (7). Entretanto, seu isolamento a partir de fezes é difícil, devido a outros microrganismos presentes que crescem mais rapidamente, mascarando a *V. enterocolitica* que é uma bactéria de crescimento mais lento; e outras vezes porque cresce de maneira semelhante a outras enterobactérias deixando de ser caracterizada corretamente.

Por este motivo, têm sido, cada vez mais, propostas novas técnicas e meios altamente seletivos, para isolar *V. enterocolitica* de fezes. Estas técnicas preconizam inicialmente um enriquecimento, que pode ser a frio (5, 12, 19) ou utilizando caldos de enriquecimento diversos (16, 17); tratamento com álcalis (13, 20) e finalmente o emprego de meios de isolamento altamente seletivos (1, 3, 4, 9, 10, 11, 14, 15, 18).

A maioria destas técnicas ou são muito demoradas ou utilizam meios de cultura muito dispendiosos ou de difícil confecção.

O objetivo deste estudo é avaliar técnicas e meios de isolamento mais simples, normalmente utilizados em laboratório de análises clínicas, mas que sejam eficientes para o isolamento de *Versinia enterocolitica* de fezes. Esta avaliação será realizada com fezes de camundongos suíços convencionais, inoculados com diferentes sorotipos de *Versinia enterocolitica*; esse tipo de animal foi anteriormente definido como bom modelo experimental no estudo de *Versinia* (8). As fezes serão examinadas utilizando-se diferentes técnicas de isolamento anteriormente padronizadas (6).

Material e Métodos

1. Microrganismos testados - *V. enterocolitica* sorotipo 0:3, biotipo 4, fagotipo VIII, isolada de fezes humana diarréica (Ye 8241); *V. enterocolitica* sorotipo 0:3, biotipo 4, fagotipo VIII, isolada de fezes diarréica de suíno (Ye 7380); *V. enterocolitica* sorotipo 0:5, biotipo 2, fagotipo Xz, isolada de fezes humana diarréica (Ye 7663); *V. enterocolitica* sorotipo 0:9, biotipo 2, fagotipo VIII, isolada de fezes humana diarréica (Ye 7168).

2. Caldos de enriquecimento e meios de isolamento

a) caldos de enriquecimento: - Caldo de Rappaport segundo Wauters (17), modificado: Solução A - solução a 1% de Triptona (Difco); Solução B - $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{M}/15$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} - 11,88\text{g}/1000\text{ml}$; Solução C - $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O} - 40\text{g}/100\text{ml}$ Água; Solução D- Verde de Malaquita-solução aquosa a 0,2%.

Misturar soluções A e B e esterilizar por autoclavagem. Aquecer a solução C até à ebullição. A solução D não deve ser esterilizada.

Meio final - misturar a frio: 155ml de A; 40 ml de B; 53ml de C; 1,6ml de D.

Caldo nutritivo (Difco), para enriquecimento a frio.

b) Meios de Isolamento: Ágar MacConkey (Difco); Ágar SS (Difco); Ágar SS (Difco) adicionado de 2% de desoxicolato de sódio (17); "Hektoen Enteric Ágar" (BBL).

3. Inoculação dos animais e coleta de material - Grupos de três camundongos foram inoculados por via intragástrica com cerca de 10^8 células de cada uma das cepas de *V. enterocolitica*.

As fezes foram coletadas e examinadas no 1º, 7º, 14º, 21º e 30º dias após a inoculação.

4. Isolamento e identificação - De cada animal foram colhidas, a cada vez, duas porções de 0,5g de fezes. Uma porção era homogeneizada em 10ml de caldo nutritivo e a outra em 5ml de caldo de Rappaport segundo Wauters (17), modificado.

O caldo de Rappaport era incubado a 22°C durante cinco dias. A seguir, semeava-se uma alcada do crescimento nos quatro meios de isolamento que eram incubados a 29°C, durante 24-48 horas. As colônias suspeitas de *Yersinia* eram submetidas a provas bioquímicas e sorológicas (6).

O homogeneizado de fezes em caldo nutritivo era semeado em placas contendo os quatro meios de isolamento, que eram incubados a 37°C por cerca de 18 horas e à temperatura ambiente (cerca de 25°C) por 24 horas adicionais. As colônias suspeitas eram caracterizadas bioquímica e sorologicamente (6).

O caldo nutritivo era incubado a 49°C durante sete dias. Quando a sementeira direta era negativa, repicava-se a partir do caldo de enriquecimento a frio nos quatro meios de isolamento utilizando o mesmo procedimento anterior.

Resultados e Discussão

Os resultados dos experimentos, representam, a média do número de unidades formadoras de colônias (UFC), obtida a partir das contagens das células isoladas das fezes dos três animais de cada lote (Tabela 1-4).

Verifica-se após a análise dessas Tabelas, que todas as semeaduras diretas de fezes coletadas após 24 horas de infecção, foram negativas. Por outro lado obteve-se 100% de positividade com o enriquecimento a frio por sete dias e semeaduras nos meios de isolamento, em pelo menos um dos meios seletivos. Por este motivo, não se deu prosseguimento ao enriquecimento a frio por três semanas, como é normalmente preconizado (6).

Tabela 1 - Unidades formadoras de colônias de *Y. enterocolitica* 0:3 (Ye 8241) com o emprego de diferentes esquemas de isolamento.

Símbolos: NT = Não testado; MC = Ágar MacConkey; Hek = "Hektoen Enteric Agar"; SS = Ágar SS; SS-D = Ágar SS + 2% de desoxicolato de sódio

Dia após inoculação	Semeadura direta /				Enriquecimento a frio				Enriquecimento Rappaport			
	MC	Hek	SS	SS-D	MC	Hek	SS	SS-D	Mac	Hek	SS	SS-D
1º	0	0	0	0	51	61	0	0	0	0	0	0
7º	260	133	52	0	NT	NT	NT	0	>300	>300	>300	1
14º	>300	>300	136	0	NT	NT	NT	0	68	67	33	0
21º	49	31	8	0	NT	NT	NT	0	20	50	8	0
30º	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0

Tabela 2 - Unidades formadoras de colônias de *Y. enterocolitica*
0:3 (Ye 7380) com o emprego de diferentes esquemas de isolamento. Vide legenda Tabela 1

Tabela 3 - Unidades formadoras de colônias de *V. enterocolitica* 0:5 (Ye 7663) com o emprego de diferentes esquemas de isolamento. Vide legenda Tabela 1.

Dia após inoculação	Semeadura direta /				Enriquecimento a frio				Enriquecimento Rappaport			
	MC	Hek	SS	SS-D	MC	Hek	SS	SS-D	MC	Hek	SS	SS-D
19	0	0	0	0	5	3	3	0	0	0	0	0
79	8	7	3	0	NT	NT	NT	0	3	2	3	0
149	4	3	1	0	NT	NT	NT	0	3	2	1	0
219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 4 - Unidades formadoras de colônias de *V. enterocolitica* 0:9 (Ye 7168) com o emprego de diferentes esquemas de isolamento. Vide legenda Tabela 1.

Dia após inoculação	Semeadura direta /				Enriquecimento a frio				Enriquecimento Rappaport			
	MC	Hek	SS	SS-D	MC	Hek	SS	SS-D	MC	Hek	SS	SS-D
19	0	0	0	0	139	23	57	21	148	48	76	0
79	0	0	0	0	15	10	5	0	11	14	2	0
149	0	0	0	0	9	6	0	0	0	0	0	0
219	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
309	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Esses resultados também mostram que em cultura feita com fezes colhidas logo após a infecção, quando o número de células é pequeno (8), é mais difícil o isolamento do microrganismo. Neste caso a *Versinia* só foi isolada utilizando técnicas de enriquecimento. Por outro lado, ocorreu 75% de positividade nas semeaduras diretas de fezes coletadas nos 79 e 149 dias de infecção, quando o microrganismo já teve oportunidade de multiplicar-se no organismo do hospedeiro (8). Esses dados confirmam os de Bottone (2), mostrando que a semeadura direta é bastante eficiente para isolar *V. enterocolitica* quando a infecção é aguda.

Foi observado que a quase totalidade dos isolamentos com os esquemas testados, ocorreram com fezes coletadas até o 149 dia de infecção, sendo que nenhuma das quatro cepas de *Versinia* foi detectada em fezes obtidas após 21 dias de inoculação. A amostra 0:9 não foi isolada em qualquer ocasião por semeadura direta.

A Tabela 5 mostra a avaliação global do desempenho dos esquemas analisados para o conjunto das quatro cepas de *V. enterocolitica* estudadas. Nela pode-se observar que a semeadura direta, seguida pelo enriquecimento a frio, foi ligeiramente superior ao enriquecimento utilizando o caldo de Rappaport; as quatro cepas foram isoladas empregando enriquecimento a frio de fezes de animais com infecção recente (24 horas) ou mais tardia (14 dias), enquanto com a utilização do caldo de Rappaport, apenas duas cepas foram isoladas de fezes coletadas após 24 horas de infecção e três mais tarde (14 dias). Só nas fezes coletadas no 79 dia de inoculação é que se conseguiu resultados iguais, com as duas técnicas. Como o período de infecção dos pacientes que se apresentam no laboratório de análises clínicas para realizar coprocultura, é variável, recomenda-se a semeadura direta, seguida de enriquecimento a frio.

Em relação aos meios de isolamento, a Tabela 5 mostra que os melhores resultados foram obtidos com o Ágar MacConkey e "Hektoen Enteric Agar", embora estudo anterior (7) tenha mostrado que esse último meio é eficaz para o isolamento de apenas alguns biotipos de *V. enterocolitica*, pelo fato dos demais biotipos fermentarem os açúcares existentes no meio, formando colônias semelhantes às de *E. coli*. O Ágar SS

Tabela 5 - Avaliação de meios e esquemas para isolamento de *Yersinia enterocolitica* de fezes após infecção experimental em camundongos. * Testados só os que deram negativo no direto.

Meio de cultura/ Esquemas	Período de coleta					Casos positivos				
	1 dia nº	1 dia %	7 dias nº	7 dias %	14 dias nº	14 dias %	21 dias nº	21 dias %	30 dias nº	30 dias %
Agar MacConkey	0	-	3	75	3	75	1	25	0	-
Agar SS	0	-	3	75	3	75	1	25	0	-
Agar Hektoen Enterico	0	-	3	75	3	75	1	25	0	-
Agar SS-Desoxicolato	0	-	0	-	0	-	0	-	-	-
Frio + MacConkey	4	100	1*	100	1*	100	0*	-	0*	-
Frio + SS	3	75	1*	100	0*	-	0*	-	0*	-
Frio + Hektoen	4	100	1*	100	1*	100	0*	-	0*	-
Frio + SS-D	1	25	0*	-	0*	-	0*	-	0*	-
Rappaport + MacConkey	2	50	4	100	3	75	1	25	0	-
Rappaport + SS	2	50	4	100	3	75	1	25	0	-
Rappaport + Hektoen	2	50	4	100	3	75	1	25	0	-
Rappaport + SS-D	0	-	1	25	0	-	0	-	0	-

mostrou-se ligeiramente inferior, enquanto que em apenas duas ocasiões isolou-se *Yersinia* em placas contendo Ágar SS adicionado de 2% de desoxicolato de sódio.

Verifica-se que para a caracterização de *Y. enterocolitica* dos sorotipos que causam doenças com maior frequência (6), as técnicas normalmente utilizadas em laboratório de análises clínicas para o isolamento de enterobactérias em geral, acrescidas pelo enriquecimento a frio, são satisfatórias. Van Noyen & col. (van Noyen, R.; Selderslaghs, R.; Wauters, G. & Valdepitte, J. - Optimal recovery of *Yersinia enterocolitica* 0:3 and 0:9 from stools of patients with intestinal disorders. In: Contrib. Microbiol., 9:, 1987. In press) chegaram ao mesmo resultado; entretanto recomendam para o isolamento das chamadas *Yersinias* ambientais, que raramente infectam o homem, mas quando o fazem, permanecem em seu organismo por um tempo mais curto e em pequeno número, a utilização de técnicas de enriquecimento associadas a um meio mais diferenciado como é o meio CIN (14).

Agradecimento

Este trabalho foi financiado em parte pela FAPESP - (Processo 79/1794).

Referências Bibliográficas

1. Agbonlahor, D.E.; Odugbemi, T. & Dosunmu-Ogunbi, O. - Differential and selective media for isolation of *Yersinia enterocolitica* from stools. J. Clin. Microbiol., 15:559-602, 1982.
2. Bottone, E.J. - Current trends of *Yersinia enterocolitica* isolates in the New York City area. J. Clin. Microbiol., 17:63-67, 1983.
3. Bowen, J.H. & Kommos, S.D. - Evaluation of a Pectin Agar Medium for isolation of *Yersinia enterocolitica* within 48 hours. Am. J. Clin. Pathol., 72:586-590, 1978.
4. Dulley, M.V. & Shotts Jr., E.B. - Medium for isolation of *Yersinia enterocolitica*. J. Clin. Microbiol., 10:180-183, 1979.
5. Eiss, J. - Selective culturing of *Yersinia enterocolitica* at low temperature. Scand. J. Infect. Dis., 7:249-251, 1975.
6. Falcão, D.P. - *Yersinia enterocolitica*. In: - Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Ateneu, Rio de Janeiro, p.79-89, 1980.

7. Falcão, D.P.; Ewing, W.H. & Dowell Jr., U.R. - Cultural characteristics of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* on differential media. In: - *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 5:88-94, 1979.
8. Falcão, D.P.; Shimizu, M.T. & Trabulsi, L.R. - Kinetics of infection induced by *Yersinia*. *Current Microbiol.*, 11:303-308, 1984.
9. Fukushima, H. & Gomyoda, M. - Growth of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* biotype 3B serotype 03 inhibited on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar. *J. Clin. Microbiol.*, 24:116-120, 1986.
10. Head, C.B.; Whitty, D.A. & Ratnan, S. - Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.*, 16:615-621, 1982.
11. Lee, W.H. - Two plating media modified with Tween 80 for isolating *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:215-216, 1977.
12. Pai, C.H.; Sorger, S.; Laffleur, L.; Lackman, L. & Marks, M.I. - Efficacy of cold enrichment techniques for recovery of *Yersinia enterocolitica* from human stools. *J. Clin. Microbiol.*, 9:712-715, 1979.
13. Ratnan, S.; Looi, C.L. & Patel, T.R. - Lack of efficacy of alkaline treatment for isolation of *Yersinia enterocolitica* from feces. *J. Clin. Microbiol.*, 18:1092-1097, 1983.
14. Schiemann, D.A. - Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can. J. Microbiol.*, 25:1298-1304, 1979.
15. Soltész, I.V.; Schalén, C. & Mardh, P.A. - An effective selective medium for *Yersinia enterocolitica* containing sodium oxalate. *Acta. path. microbiol. scand. Sect. B*, 88:11-16, 1980.
16. Van Noyen, R. & Vandepitte, J. - L'isolement de *Yersinia enterocolitica* par une technique usuelle de coproculture. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, 114:463-467, 1968.
17. Wauters, G. - Improved methods for the isolation and the recognition of *Yersinia enterocolitica*. In: - *Contrib. Microbiol. Immunol.*, 2:68-70, 1973.
18. Weagant, S.D. - Medium for presumptive identification of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Env. Microbiol.*, 45:472-473, 1983.
19. Weissfeld, A.S. & Sonnenwirth, A.C. - *Yersinia enterocolitica* in adults with gastrointestinal disturbances: need for cold enrichment. *J. Clin. Microbiol.*, 11:196-197, 1980.
20. Weissfeld, A.S. & Sonnenwirth, A.C. - Rapid isolation of *Yersinia* sp from feces. *J. Clin. Microbiol.*, 15:508-510, 1982.

A NEW MEDIUM FOR THE DETECTION AND ENUMERATION OF *BACILLUS CEREUS* IN FOOD

Leon Rabinovitch
& Fernando José Meira de Vasconcellos

Deptº de Bacteriologia
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz
Caixa Postal 926
20001 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

A new selective medium for the detection of large celled Group I *Bacillus* and the identification of *Bacillus cereus* in food is described. In this medium it is possible to perform presumptive enumeration of *B. cereus*. It replaces the usual media of Mossel (MYP) and Kim (KG) with bacteriological and economical advantages.

Resumo

Um novo meio para detecção e contagem de Bacillus cereus em alimento

É descrito um novo meio seletivo para a detecção dos grandes *Bacillus* do Grupo I ocorrentes em alimentos. Neste meio, é possível proceder-se à contagem presuntiva da espécie citada. O meio substitui os tradicionais meios de Mossel (MYP) e de Kim (KG) com vantagens econômicas e bacteriológicas.

Bacillus cereus has been incriminated as the causative agent for mild forms of food poisoning due to the production of at least two enterotoxins (Midura, T. & col., Public Health Rep., 185:45-48, 1970; Morris Jr., J.G., Arch. Inst. Med., 141:711, 1981; Portnoy, B.L. & col., Amer. J. Epidemiol., 103:589-594, 1976; Raevuori, M. & col., J. Hyg. Camb., 76:316-327, 1976; Terranova, W. & Blake, P. A., New England J. Med., 298:143-144, 1978; Turnbull, P.C.B. & col., J. Exp. Path., 58:273-280, 1977). For this reason this bacteria has assumed importance in the microbiological control of raw or processed food. It seems probable that there is a correlation between the number of *B. cereus* ingested and the clinical symptoms. This number could be 10^6 cells per gram or more (FDA, Bur. of Foods, Bacteriol. Analyt. Man. Foods, 6th, chap. 16, Wash., D.C. 1984). However Rabinovitch & col., (Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 80:1-9, 1985) presented evidence that lower titres (500 to 6000 cells/gram) could be enough to produce a clinical response.

There is at present few widely accepted media for the detection and enumeration of *B. cereus* in food. Those are mainly employed for additional biochemical tests including detection of egg-yolk precipitation of hydrolysed lecithin beneath or around colonies. They are : Mossel's Polymyxin B - egg yolk Mannitol Phenol Red selective medium - MYP (Mossel, D.A.A. & col., Appl. Microbiol., 15:650-653, 1967) and Kim's KG medium (Kim, H.U. & Goepfert, P.M., App. Microbiol., 22:581-587, 1971). Both media seem to have identical performance in sensitivity and selectivity. Goepfert (In: - Compend. Methods for the Microbiological Exam. of Foods. APHA, USA, p.417-423, 1976) however stresses some advantages of the KG medium such as the early development of free spores and endospores within 20-24 hours. In this way it

is possible to show, besides the precipitation around colonies, presence of Group I *Bacillus* by observation of cell size as well as to separate *B. cereus* from *B. thuringiensis*, by demonstration of parasporal body in the later. In MYP's medium, the presence of large numbers of mannitol fermenters often prevent the detection of non fermenter colonies.

Other suggested media such as polymyxin, pyruvate-egg yolk - mannitol - bromothymol blue-agar, PEMBA (Holbrook, R. & Anderson, J.M., Can. J. Microbiol., 26:753-759, 1980) and Polymyxin, pyruvate-egg yolk - mannitol and bromocresol purple-agar, PEMBA (Szabo, R.A. & col., J. Food Protect., 47:858-860, 1984), do gives no egg-yolk reaction and can be discarded in 30 hours as in MYP and KG media. *B. thuringiensis*, *B. cereus* and *B. anthracis* give sharp positive reaction while all other strains do not seem to offer additional advantages over the two media discussed above. Szabo & col., 1984, using MYP, PEMBA and PEMBA showed comparable performance of all three media and a decreased incubation time from 48 to 22 hours were revealed by PEMBA medium.

Presently available media are imported and as such quite expensive and not easily obtainable. To overcome this problem and to improve the bacteriological procedures for detection of *B. cereus* in food we have developed medium RVC which can replace with advantage those in current use. The formula in grams/liter is as follows: Trypticase (BBL) or Tryptone (Difco) or similar casein-peptone - 1.0; Methylene blue (George T. Gurr) - 5×10^{-3} ; D(+) Glucose (Reagen) - 0.2; NaCl (Reagen) - 3.0; Na₂HPO₄ (J.T. Baker) - 7×10^{-2} ; MgSO₄.7H₂O (Reagen) - 2×10^{-2} ; ZnSO₄.7H₂O (J.T. Baker) - 5×10^{-3} and Agar (Difco) - 1.8×10^1 - pH is adjusted to 7.9 with NaOH prior to autoclaving (1atm- 20 min.). To the melted and cooled (50° - 53°C) sterile solution, 10ml/l of a fresh sterile egg-yolk homogenized (15 min) with a magnetic stirrer is added, followed by a cold sterilized solution of colistin (Lafi, polymyxin E sulfate) or polymyxin B sulfate (Pfizer) to give 50U/ml of medium. After through homogenization avoiding foam, RVC is poured into plates. If food is suspected of containing numerous Gram-negative flora final concentration of antibiotics may be increased to 80U/ml. However, if a large number of moulds are suspected of being present, 10ml of a filter sterilized 0.4% (W/V) aqueous solution of actidione (Holbrook, R. & Anderson, J.M., Can. J. Microbiol., 26:753-759, 1980) together with polymyxin may be added. After cooling, pH will be near 7.3-7.4 and medium will become celestial - blue in color. In vacuum polyethylene saks kept under refrigeration (49C±19C), RVC may last 3 weeks. Methylene-blue concentrations above that indicated in our formula may inhibit growth of Gram positive bacilli.

The performance of RVC is shown in Figure 1. Clearly *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* were inhibit by polymyxin E (50U/ml) while *Salmonella* sp., Arizona and *B. megaterium* were not. Higher concentration of polymyxin E at 80U/ml also inhibit *Salmonella* and Arizona. After incubation at

Figure 1 - Some *Bacillus* and other bacteriae grown in RVC medium containing 50U/ml of polymyxin E (sulfate). Only *B. cereus* Al 42 (1) gave egg yolk reaction positive. *Klebsiella pneumoniae* (3) and *Pseudomonas aeruginosa* (5) were inhibited (40 hours incubation at 33°C). Symbols: 2 = *Salmonella* sp; 4 = Arizona; 6 = *B. megaterium* ATCC 10778, see text.

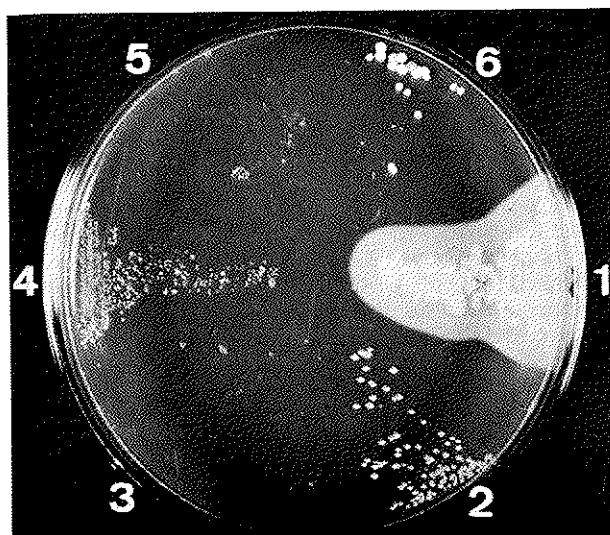


Table 1 - Large celled and other *Bacillus* species together with Gram-negative bacteria strains used to evaluate RVC- medium performance. Symbols: (a) = National Collection of Industrial and Marine Bacteria, U.K.; (b) = Received from Lab. Lutte Biologique II, Inst. Pasteur, Paris, France; (c) = Lab. Fisiol. Bacteriana, Dep. Bacteriologia, Inst. Oswaldo Cruz, RJ, Brasil; (d) = National Collection of Type Cultures, London, U.K.; (e) = Received from Jan Dick van Elsas, and (f) = Lucy Seldin, Inst. Microbiologia, U.F.R.J., RJ, Brasil; (g) = American Type Culture Collection, Maryland, USA; (h) = Received from Valter R. Linardi, Dep. Microbiol. - ICB, UFMG, MG, Brasil; (i) = Received from Dilma S. Gelli, Inst. Adolfo Lutz, SP, Brasil; (j) = Received from Sônia Maria da Silva, Inst. Vital Brasil, RJ, Brasil; (k) Received from Manoel A. Portugal, Inst. Biológico, SP, Brasil; (l) = Received from Sebastiao J. Silva Filho, Dep. Bacteriologia, Inst. Oswaldo Cruz, RJ, Brasil; * = Strains related with food borne disease (Rabinovitch & col., 1985).

<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>B. megaterium</i>
NCIB 9134 (a)	1 (b)	IOC - 572 (e)
var. tolworthii (b)	8 (b)	IOC - 575 (e)
var. pakistani (b)	19 (b)	NCIC - 10342 (f)
var. sutto (b)	27 (b)	ATCC 10778 (g)
var. morrisoni (b)	AL 10 (c)*	<i>B. anthracis</i>
var. israelensis (b)	AL 11 (c)	IOC - 579 (h)
var. kurstaki (b)	AL 42 (c)*	IAL - 116 (i)
var. sutto 1028 (b)	AL 72 (c)	IVB - 1 (j)
var. sutto 1180 (b)	AL 76 (c)	IVB - 2 (j)
<i>B. licheniformis</i>	NCIC 2599 (d)	IB - (k)
ATCC 6384 (g)	<i>Proteus vulgaris</i> (l)	<i>B. polymyxa</i>
ATCC 33632 (c, g)	<i>Proteus mirabilis</i> (l)	NCIC 10313 (f)
<i>B. subtilis</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i> (l)	<i>B. sphaericus</i>
NCIC 3610 (d)	<i>Providencia rettgeri</i> (l)	IP 22977 (b)
var. aterrimus	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (l)	<i>B. circulans</i>
IOC 121 (e)	<i>Salmonella</i> sp (l)	NCIC 2610 (d)
Arizona (l)		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (l)	

33 - 34°C lecithinase positive colonies shows a white halo of turbidity in contrast with other colonies. Cooling the plates at least for 5 hours at 5°C will enhance the reaction. *B. megaterium* colonies tested were negative (Table 1). This may be due to the presence, in our medium RVC, of Zn++ ions known to favor the lecithinase reaction. It is known that *B. cereus* phospholipase C (phosphatidyl cholinecholine phosphohydrolase, E.C. 3.1.4.3) has 2 atoms of this metal per molecule tightly bounded (Little, C. & Otnass, A.B., Biochem. Biophys. Acta, 391:326-333, 1975). Perhaps, this is the reason why all large celled *Bacillus*, excluding *B. megaterium*, do not fail to produce precipitate or turbidity zones around colonies. When growing in RVC, typical colonies of large celled *Bacillus* may be examined for cell dimension, free spore size shape, position of spore in sporangium and parasporal inclusions (proto - toxin crystals within 30 - 40 hours).

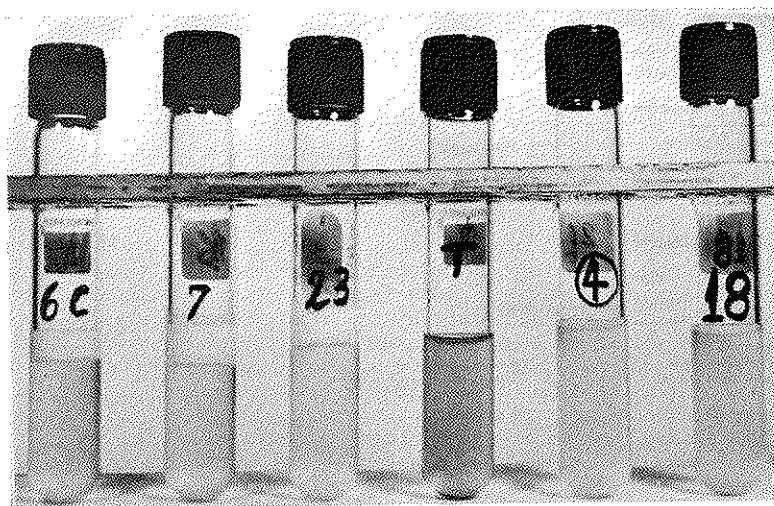
The efficiency of plating between RVC and a non inhibitory medium is shown in Table 2. It can be seen that there is no significant difference ($p<0.01$) in the number of colony forming units/ml between Nutrient Agar and RVC medium, demonstrating that RVC medium does not cause inhibition to *B. cereus*.

Table 2 - Comparison between colony counts of *B. cereus* grown in RVC and Nutrient Agar (AN) 30 hours after inoculation of a milk sample previously contaminated with the bacteria.

Symbols: * = Grown for 32 hours at 34°C in AES (Agricul. Handbook n° 427, U.S.D.A., pp. 100-101, 1973), and transferred by pinpoint inoculum to 10ml of pasteurized milk (3,2% of fat) followed by homogenization and dilution 10¹ until 10⁴; 0.1ml of each dilution were deposited into plates. Spores were present in inoculum. For strain details see Table 1.

Strains*	Number of colony forming units/ml		AN
	RVC	Figures × 10 ⁴	
AL 10	5.21	Figures × 10 ⁴	6.04
	4.82		5.76
	5.00		5.25
	5.61		5.44
means	5.16		5.62
AL 42	5.54	Figures × 10 ⁴	5.89
	5.57		4.84
	6.08		5.75
	4.38		6.29
means	5.42		5.94

Figure 2 - Liquid RVC medium without antibiotic. Tubes to the left show typical white floating ring. Strains 6c, 7 and 23 are *B. thuringiensis* var. *sotto* (1180), *B. cereus* - 8 and *B. anthracis* - 1B, respectively. Tube "T" contains sterile RVC in which methylene blue is not reduced and 4 and 18 contains *Salmonella* sp and *B. megaterium* ATCC 10778, respectively (40 hours incubation at 33°C)

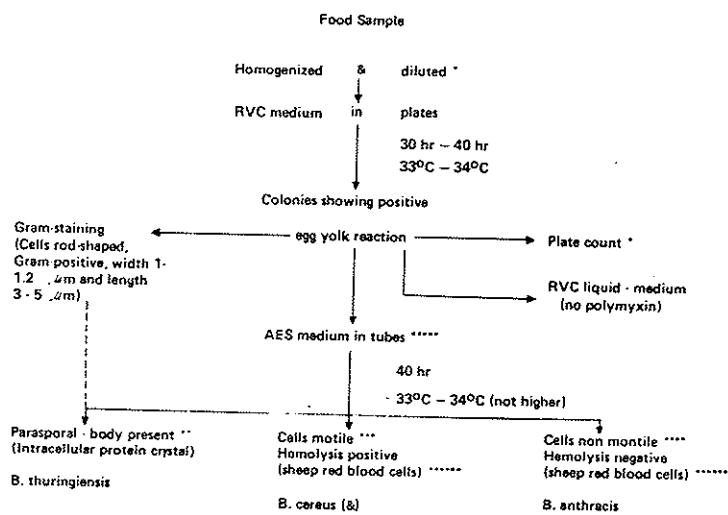


RVC without agar and polymyxin can be used as a liquid medium for the detection of lecithinase by suspected pure cultures. If positive a white floating ring appears near the surface (Figure 2). In our hands none of the 19 strains of large celled *Bacillus*, excluding *B. megaterium*, failed to produce this ring even those which normally give hydrolysed products diffused by all liquid media. This is at variance with Mc Gaughy & Chu (J. Gen. Microbiol., 2:334-341, 1948). They describe samples of *B. cereus* which elaborate by products of lecithin hydrolysis which diffused through the liquid medium while other strains produce as in our case the typical ring. The rapid decolorization of methylene blue in our medium favors the easy observation of the bacterial growth by increasing the contrast between the white ring and the remaining yellowish liquid.

The RVC medium is therefore suitable for use in recommended procedures, including the FDA schedule (FDA, Bur. of Foods, Bacteriol. Analyt. Man. Foods, 6th, chap. 16,

Figure 3 - Practical procedure for identification and count of *B. cereus* in food.

Symbols: * = After FDA's Bacteriol. Analyt. Man. Foods, 6th, 1984, or other suitable analytical procedure; ** = Harmon's (J. Ass. Off. Anal. Chem., 65:1134-1139, 1982) staining method and/or direct microscopy of light cell suspension in saline (NaCl 0,85%); *** = From 50 to 90% of strains (FDA, Bacteriol. Analyt. Man. Foods, 6th, 1984), or 11 to 89% of strains (Bergey's Man. of Determin. Bacteriol., 8th, pp. 520-575, 1974); (&) = When colonies are rhizoid and cells are non motile - *B. cereus* var. *mycoides* (FDA, Bacteriol. Analyt. Man. Foods, 6th, 1984); **** = From 90 to 100% of strains (FDA, Bacteriol. Analyt. Man. Foods, 6th, 1984; Bergey's Man. of Determin. Bacteriol., 8th, pp. 520-575, 1974); ***** = The production of free spores and endospores after 40 hours at 33° - 34°C in Soil-Extract Agar, AES, is extremely helpful for the study of motility and parasporal inclusions (Agricultr. Handbook n° 427, U.S.D.A., pp. 100-101, 1973); ***** = FDA - Bacteriol. Analyt. Man. Foods, 6th, 1984.



Wash. D.C. 1984) for the identification and enumeration of *B. cereus* in food. This is presented diagrammatically in Figure 3.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Drs. Carlos André Salles and Hooman Momen for helpful criticism of the manuscript and the donors mentioned in the text for supplying the cultures used in the tests. We would also like to thank Genilto José Vieira for taking photographs, Vicente de Paulo M. Oliveira for typing the manuscript and Joel Antunes for preparing Figure 3.

GRUPOS DE BACTÉRIAS ISOLADAS A PARTIR DE AMOSTRAS DE FÍGADO DE BOVINO

Maria de Fátima F.F. Gomes
Sirdéia Maura Perrone Furlanetto

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

Resumo

Foram isoladas 50 amostras de fígado de bovino comercializado em feiras livres do Município de São Paulo. Foram efetuadas as contagens de bactérias psicrófilas e mesófilas, contagem e identificação de *Staphylococcus aureus*, determinado o Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes totais, fecais e de *E. coli*. A contagem de bactérias psicrófilas e mesófilas variou de $3,2 \times 10^3$ a $2,03 \times 10^7$ /g e de $4,5 \times 10^5$ a $2,8 \times 10^7$ /g do alimento, respectivamente. Para as bactérias coliformes totais o NMP mínimo foi de 90 e o máximo de $>2,4 \times 10^5$ /g, enquanto que para os coliformes fecais e *E. coli*, em particular, os resultados variaram de <9 a $>2,4 \times 10^5$ /g. Quanto às contagens de *S. aureus*, estas variaram de 50 a $5,0 \times 10^4$ /g do produto analisado. Das 50 amostras examinadas 29 (58%) apresentaram valores superiores ao máximo estabelecido nos padrões adotados pelo Ministério da Saúde e Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, os quais permitem a presença de, no máximo, $3,0 \times 10^6$ /g de bactérias mesófilas. Dezenove (38%) amostras apresentaram-se dentro dos valores permitidos pelos padrões acima referidos, que toleram, no máximo, a presença de $3,0 \times 10^2$ /g de microrganismos coliformes fecais no alimento em questão.

Summary

Bacterial groups isolated from beef liver.

In order to verify the bacteriological conditions of beef liver, fifty samples of beef liver were acquired in various markets in the city of São Paulo. On these samples, bacterial counts per gramme of food were carried out, considering psychrophilic and mesophilic aerobic of facultative anaerobic bacteria, and *Staphylococcus aureus*. Determination of the Most Probable Number (MNP) of coliforms, faecal coliforms and *Escherichia coli* were also carried out. The counts for psychrophilic and mesophilic bacterial ranged $3,2 \times 10^3$ to $2,03 \times 10^7$ per g and from $4,5 \times 10^5$ to $2,8 \times 10^7$ per g of food, respectively. As to coliform bacteria, the MNP ranged from 90 to $>2,4 \times 10^5$ per g, while as to faecal coliforms and, particularly, *E. coli*, the MNP ranged from <9 to $>2,4 \times 10^5$ per g of beef liver. In relation to *S. aureus* count, this ranged from 50 to $5,0 \times 10^4$ per g of product. Considering the fifty samples of beef liver analysed, 29 (58%) presented counts above the maximum values allowed ($3,0 \times 10^6$ /g) by normal standards of "Mistério da Saúde" and "Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo" for the mesophilic bacteria. Concerning faecal coliforms, only 19

(38,8%) from all examined samples were withing the values adopted by standards before mentionated, which permit, as maximum values, $3,0 \times 10^2$ per g of product.

Introdução

O fígado é um alimento de alto valor nutritivo por conter alto teor de ferro e proteínas, sendo utilizado, por esta razão, como parte da terapia de algumas doenças, entre elas a anemia, quando este alimento é oferecido cru aos pacientes. É empregado muitas vezes como suplemento proteico na forma de pó, o qual recebe um tratamento térmico muito baixo, sendo ministrado a pessoas idosas, mal nutridas ou doentes (26). Shelef (24) analisando a deterioração de fígado de bovino, observou a presença de cocos Gram-positivos, coliformes, bacilos Gram-negativos e formas esporuladas. Após 5-7 dias de estocagem a 5°C, o autor encontrou a presença de bactérias ácido lácticas como principal microflora deteriorante, sendo que a contagem apresentada era de 7 a 8×10^7 /g do produto. Hanna e cols. (9) analisando fígado de bovino, encontraram, inicialmente, a presença de *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter* e bactérias corineformes. Após ser estocado por 5 dias a 29°C, o fígado apresentou, predominantemente como microflora deteriorante, *Streptococcus* sp, *Pseudomonas* sp e leveduras.

No que concerne a presença de *Staphylococcus aureus* em fígado de bovino, Jay (13) encontrou uma contaminação de 42% nas amostras do produto analisado.

Pelo exposto e dada a falta de investigações neste tipo de alimento em nosso meio, procurou-se verificar as condições bacteriológicas das amostras de fígado de bovino comercializado em feiras livres do Município de São Paulo, através das contagens de bactérias aeróbias ou facultativas psicrófilas, mesófilas e *S. aureus*, da determinação do NMP de bactérias coliformes totais, fecais e de *E. coli*.

Material e Métodos

As amostras de fígado de bovino foram transportadas ao laboratório, sendo pesadas, assepticamente, 25 gramas do produto. Esta porção foi homogeneizada em 225ml de água tamponada fosfatada estéril, obtendo-se desse modo a diluição inicial (10^{-1}) e, a partir desta, conseguidas as demais diluições decimais (10^{-2} a 10^{-5}).

A partir das diluições foram feitas as seguintes determinações quantitativas:

Contagem de bactérias aeróbicas facultativas, psicrófilas e mesófilas, segundo Harrigan & McCancer (10). Estas contagens foram realizadas empregando-se o ágar padrão e a incubação a 35°C por 48 horas para as bactérias mesófilas e a 5°C por 7 dias, para as psicrófilas.

Contagem, isolamento e identificação de S. aureus, segundo Thatcher & Clark (25). Na contagem destas bactérias, 0,2ml de cada diluição do material a ser analisado foi depositado na superfície do ágar Baird-Parker, em placas de Petri. O inóculo foi espalhado em toda a superfície do meio por intermédio de um bastão de vidro em "L" esterilizado e, em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 e 48h. Após a contagem e isolamento das cepas, estas foram submetidas às provas de catalase, coagulase, desoxirribonuclease e de oxidação e fermentação da glicose.

Determinação do NMP de bactérias coliformes, segundo o ICMSF (12). De cada diluição foram transferidos 1ml, respectivamente, em 3 tubos de caldo lauril sulfato triptose, o qual foi incubado a 35°C por 24 e 48h. A determinação do NMP de bactérias coliformes totais foi realizada a partir do número de porções positivas, usando-se a Tabela de "Números Mais Prováveis" (Hoskins 1, 2).

Determinação do NMP de bactérias coliformes fecais e E. coli em particular, segundo o ICMSF (12). A partir dos tubos da prova presuntiva para coliformes totais foram semeados tubos de caldo EC, que foi incubado a 45,5°C por 24 e 48h. A partir dos resultados obtidos, determinou-se o NMP/g de bactérias coliformes fecais, empregando-se a Tabela de Hoskins (1, 2). Na quantificação de *E. coli* foram

utilizados os tubos positivos provenientes do caldo EC, os quais foram submetidos às provas bioquímicas do IMVIC e, posteriormente, se determinou o NMP de *E. coli*, usando-se a Tabela de Hoskins (1, 2).

Resultados e Discussão

Dependendo do tipo de alimento e do número inicial de microrganismos presentes, o alimento mantido sob temperatura de refrigeração não está livre de ser deteriorado, mas tem apenas o seu período de vida útil um pouco mais ampliado.

Quando se trata de órgãos comestíveis, como é o caso do fígado, a sua deterioração segue um comportamento diferente do que sucede à carne. Segundo Shelef (24), o tipo de deterioração que ocorre em fígado de bovino é devido, principalmente, a sua constituição bioquímica, diferente da observada para a carne. A principal diferença diz respeito à composição, relativa ao teor de carboidratos que, segundo Lawrie (16) no fígado é de 5,3% sob a forma de glicogênio, enquanto que na carne é de apenas 0,1% de glicogênio e de 0,01% de glicose. Shelef (24) é de opinião que o fígado, dado o seu alto teor em carboidratos, possui uma microflora deteriorante, constituída principalmente por bactérias ácido-lácticas. Estas bactérias seriam as responsáveis pela queda do pH de 6,3 (fígado fresco), para 5,9 (fígado deteriorado), assim como pelo tipo de deterioração ácida apresentada. Jay (15) atribui ao pH mais elevado do fígado em relação ao da carne, o fato da sua deterioração ocorrer em menor espaço de tempo.

Gardner (7) estudando fígado de suíno, constatou a presença de contaminação de origem microbiana predominantemente superficial e após 7 dias de estocagem em condições aeróbicas, a 5°C, a deterioração resultante era do tipo proteolítico, com predominância de bactéria dos gêneros *Alcaligenes* e *Pseudomonas*. Quando o mesmo material era estocado em sacos de polietileno, onde nem todo ar era retirado, sob as mesmas condições de temperatura e tempo de incubação, a deterioração apresentada pelo fígado era do tipo ácida, sendo esta atribuída, principalmente, a bactéria do gênero *Leuconostoc* e a estreptococcus lácticos.

Segundo Witter (28), as bactérias psicrófilas teriam pouco ou nenhum significado em termos de saúde pública, pois este grupo não contém espécies patogênicas. O seu significado relaciona-se às condições higiênico-sanitárias dispensadas ao produto, uma vez que boas condições de manuseio e estocagem a temperaturas adequadas de refrigeração, propiciam o encontro de contagens baixas destes microrganismos. Portanto, uma contagem alta de bactérias psicrófilas pode significar o uso de práticas higiênicas inadequadas.

No presente estudo, pela Tabela 1, observa-se para as amostras de fígado de bovino analisadas, que a contagem mínima de bactérias psicrófilas obtida foi de $3,2 \times 10^3$ e a máxima de $2,03 \times 10^7$ por grama, sendo a média aritmética em torno de 10^6 por grama. Na Tabela 2, nota-se que 20 (40%) amostras revelaram-se com um número de bactérias psicrófilas em torno de 10^5 por grama e 6 (12%) mostraram-se com um número destas bactérias acima de 10^6 por grama. Deve ser salientado que dada a natureza do alimento analisado, ou seja, considerando tratar-se de um produto altamente perecível. Os valores referidos são importantes pois mostram que este produto pode deteriorar-se com muita facilidade, em período curto de tempo, mesmo mantido sob refrigeração.

A este respeito, estudando fígado de bovino, Shelef (24) constatou que, quando a população de bactérias psicrófilas atingia valores da ordem de 7 a 8×10^7 por grama, após 7 a 10 dias de estocagem à temperatura de 5°C, o produto era rejeitado dada a presença de alterações nas suas características organolépticas. Em nosso meio, observa-se que nos padrões microbiológicos para alimentos, adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, não constam parâmetros relativos a bactérias psicrófilas em carnes e produtos derivados. Contudo, comparando-se os valores obtidos com os propostos pela Sociedade Veterinária de Higiene Alimentar (Ribeiro 24) depreende-se que 12% das amostras de fígado analisadas estão acima dos valores tolerados, ou seja, de no máximo 10^6 por grama (Tabela 2).

As bactérias mesófilas são consideradas como sendo um dos melhores indicadores da qualidade microbiológica dos alimentos, podendo fornecer indicações tanto das

condições higiênicas do seu preparo e armazenamento, quanto do risco potencial de saúde que pode representar ao consumidor. Segundo Levine (17), a contagem padrão em placas • (C.P.P.) de bactérias aeróbicas mesófilas, é considerada a indicadora mais segura da qualidade higiênica ou de armazenamento adequado do alimento, mais do que qualquer outro indicador microbiológico rotineiramente utilizado. Mossel & Tarr (20) consideram que, de maneira geral, um alimento pode ser considerado como potencialmente perigoso no momento do consumo, quando este alimento não fermentado apresentar uma contagem de bactérias mesófilas superior a 10^5 por grama. As bactérias mesófilas podem indicar, ainda, que a temperatura de refrigeração durante o armazenamento do alimento não foi suficientemente baixa, a ponto de prevenir o crescimento de tais microrganismos.

Hanna e cols. (9) estudaram o comportamento da microflora deteriorante de algumas vísceras comestíveis de vários animais. Os órgãos, tais como fígado de suínos e bovinos, foram colhidos logo após o abate, procurando-se determinar que microrganismos poderiam ser encontrados quando esses produtos eram obtidos sob boas condições de manuseio e mantidos a temperatura adequadas de estocagem. Os autores verificaram que quando o fígado era pronta e adequadamente refrigerado, não ocorria aumento acentuado da população microbiana após 5 dias de estocagem a 29°C. Constataram, por exemplo, em uma das amostras de fígado de bovino que a C.P.P. de bactérias mesófilas aeróbias foi de $2,4 \times 10^2$ por cm^2 ao ser obtida e de $6,2 \times 10^2$ cm^2 após 5 dias de manutenção nas condições anteriormente mencionadas. Em uma amostra de fígado de suíno, também como exemplo, esses valores foram $2,2 \times 10^2$ por cm^2 e $8,3 \times 10^2$ cm^2 , respectivamente. Verificaram, entretanto, que se as amostras de fígado fossem mantidas em temperaturas mais elevadas, como 30°C, por 6 a 12 horas antes de serem congeladas, tais contagens revelavam-se aumentadas. Assim, em uma amostra de fígado de suíno, as contagens de bactérias mesófilas foram de $1,02 \times 10^2$ por cm^2 logo após o abate e de $1,41 \times 10^3$ por cm^2 , após 6 horas a 30°C; em outra amostra, tal contagem foi de $6,17 \times 10^2$ por cm^2 logo após o abate e de $6,3 \times 10^5$ após 12 horas de permanência a 30°C. Uma situação semelhante pode ocorrer se tais órgãos forem degelados à temperatura ambiente (25°C) por 24 e 48 horas, onde as C.P.P. de bactérias mesófilas em uma amostra variaram de 10^5 por cm^2 , logo após a retirada do produto do congelador, para $2,08 \times 10^5$ por cm^2 após 24 horas em ambiente a 25°C e para $5,78 \times 10^8$ por cm^2 em 48 horas, nestas mesmas condições.

Gardner (7), em amostras de fígado fresco de suínos, obteve resultados médios da C.P.P. de $4,1 \times 10^4$ por grama, sendo que, após o produto ser estocado por 7 dias à temperatura de 59°C, tal valor aumentou para $4,6 \times 10^8$ por grama. Seu estudo mostrou também que à temperatura de 59°C, o fígado se deteriorava em 7 dias. Shelef (24) concluiu de forma semelhante numa pesquisa realizada com fígado de bovino, onde tal produto teria sido rejeitado pelas características organolépticas alteradas após 7 a 10 dias de estocagem à temperatura de 59°C, em que o nível de contaminação atingia níveis de 7 a 8×10^7 microrganismos por grama do produto. Segundo Mossel & Tarr (20), deve ser salientado, que se um alimento não preparado pelo processo de fermentação, apresentar um número de bactérias mesófilas acima de 10^7 por grama, este alimento será inaceitável por estarem os seus caracteres organolépticos alterados. Analisando-se a Tabela 1 pode-se observar que nas análises das 50 amostras de fígado de bovinos recém adquiridas, a contagem mínima para bactérias

Tabela 1 - Distribuição das amostras de fígado de bovino examinadas segundo a variação dos números de bactérias pesquisadas por grama e as respectivas médias aritméticas.

Símbolos: * = Os valores para *E. coli* foram os mesmos obtidos com relação a coliformes fecais; ** = NMP = Número mais provável

Microrganismos	Medidas estatísticas		
	Valores	Contagem/g ou NMP/g (**)	Média Aritmética
Bactérias psicrófilas	mínimo máximo	3.200 20.300.000	1.004.646
Bactérias mesófilas	mínimo máximo	450.000 28.300.000	6.027.800
<i>Staphylococcus aureus</i>	mínimo máximo	<50 50.000	<2.748
Coliformes totais	mínimo máximo	90 >240.000	>47.630
Coliformes fecais*	mínimo máximo	9 >240.000	>19.640

Tabela 2 - Distribuição das 50 amostras de fígado de bovino examinadas segundo a contagem de bactérias psicrófilas e mesófilas e o Número Mais Provável (NMP) de bactérias coliformes totais e fecais por grama.

Símbolos: * = Os valores para *E. coli* foram os mesmos obtidos com relação a coliformes fecais; ** = Resultado para uma amostra não computada por ter sido prejudicado

Microrganismos Nº/g ou NMP/g	Bactérias				Coliformes				
	Psicrófilas		Mesófilas		Totais		Fecais*		
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
<10	-	-	-	-	-	-	2	4,1	
10	10 ²	-	-	-	1	2,0	10	20,4	
10 ²	10 ³	-	-	-	1	2,0	20	40,5	
10 ³	10 ⁴	7	14,0	-	23	46,0	8	16,6	
10 ⁴	10 ⁵	17	34,0	-	15	30,0	3	6,2	
10 ⁵	10 ⁶	20	40,0	3	6,0	10	20,0	6	12,2
10 ⁶	10 ⁷	5	10,0	40	80,0	-	-	-	
10 ⁷	10 ⁸	1	2,0	7	14,0	-	-	-	
Total	50	100,0	50	100,0	50	100,0	49**	100,0	

mesófilas foi de $4,5 \times 10^5$, a máxima de $2,8 \times 10^7$ e a média aritmética de aproximadamente $6,0 \times 10^6$ por grama do produto. Comparando-se estes resultados com os obtidos por Hanna (9), verifica-se que no presente estudo a contagem de mesófilas, de $4,5 \times 10^5$ por grama, foi superior a constatada por esse autor, ou seja, de $2,4 \times 10^2$ por grama quando ele analisou fígado de bovinos recém-adquiridos e, praticamente, equivalente à contagem obtida após ter exposto o fígado de suínos a 30°C por 12 horas ($6,03 \times 10^5$ /g). A mesma comparação pode ser feita com os resultados obtidos em trabalho realizado por Gardner (7), onde analisando amostras de fígado de suínos recém-adquiridos obteve uma C.P.P. para bactérias mesófilas de $4,1 \times 10^4$ por grama e, portanto, inferior a contagem mínima obtida no presente estudo, ou seja, de $4,5 \times 10^5$ por grama, sob as mesmas condições.

Os padrões microbiológicos para alimentos atualmente em vigor a nível nacional, são os adotados pelo Ministério da Saúde, que compõe a Portaria nº 01 de 28 de janeiro de 1987, da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (19). Não estabelecem critérios microbiológicos para carnes ou miúdos, com exceção para bactérias do gênero *Salmonella* onde exige-se a ausência em 25g do produto. Por outro lado, no Estado de São Paulo, existem padrões microbiológicos para alimentos que estão incluídos nas Normas Técnicas especiais relativas a Alimentos e Bebidas (23) aprovada pelo Decreto nº 12486, de 20 de outubro de 1978. Através da Norma Técnica nº 3 com relação a carnes cruas, preparadas ou não e os miúdos, estes padrões toleram no máximo a presença de 3×10^6 por grama de bactérias mesófilas, de 3×10^2 por grama de bactérias coliformes de origem fecal e de 2×10 por grama de clostrídios sulfitos-redutores a 44°C e exigem, ainda, ausência de *Salmonellas* em 25g do produto.

A este respeito, de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho observa-se que 29 (58%) das 50 amostras analisadas revelaram-se com valores correspondentes a C.P.P. de bactérias mesófilas superiores ao máximo tolerado pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Segundo Ribeiro (22), os padrões portugueses para carnes retalhadas toleram valores da C.P.P. de bactérias mesófilas de, no máximo, 10^5 por grama. Por outro lado, Jay (15) refere que em Massachusetts tal tolerância é também de 10^5 por grama. Assim sendo, considerando-se que se tais exigências fossem também aplicadas a miúdos no Brasil, com relação a C.P.P., no presente estudo, 100% das amostras de fígado de bovinos analisadas estariam fora de ambos os padrões de bactérias mesófilas por grama.

Pode-se supor, pelos resultados apresentados, que as amostras analisadas foram obtidas de fígado de bovinos mantidos, provavelmente em temperatura ambiente, por um espaço de tempo suficiente para permitir a proliferação de bactérias num índice muito elevado. Pode-se supor, porém, que outros fatores tenham contribuído para o aumento e possível disseminação da contaminação aliados a inadequação da temperatura de conservação, pois observou-se que este produto era exposto à venda sobre os balcões da barraca, onde a presença de moscas e o manuseio inadequado por parte dos vendedores e compradores eram constantes.

Quanto à presença de bactérias coliformes totais nas amostras de fígado de bovinos, constata-se, pela Tabela 2, que 49 (88%) das amostras analisadas apresentaram valores do N.M.P. dessas bactérias superiores a 10^2 por grama. De outra parte, através da Tabela 1 observa-se que o N.M.P. de coliformes totais mínimo foi de 90 por grama e o máximo $2,4 \times 10^5$ por grama, sendo a média aritmética superior a $4,7 \times 10^4$ por grama.

Os padrões microbiológicos brasileiros para carnes e miúdos não prevêm parâmetros relativos a coliformes totais. Os padrões bacteriológicos de alimentos portugueses (22), permitem, porém, a presença de coliformes totais em números inferiores a 10^2 por grama de carnes frescas. Assim sendo, considerando-se, ainda, a aplicação destes parâmetros também a miúdos, 49 (98%) das amostras analisadas no presente trabalho poderiam ser considerados impróprias ao consumo. No Estado de Massachusetts (15), o padrão para coliformes adotado é o mesmo que o exigido nos padrões portugueses (22). Portanto frente a este padrão, o mesmo percentual de amostras de fígado analisadas neste estudo, estaria imprópria ao consumo.

Em relação aos coliformes fecais, observa-se, na Tabela 2, que 37 (75,5%) das 49 amostras analisadas continham um NMP destas bactérias superior a 10^2 por grama, sendo o valor mínimo encontrado 9, o máximo $2,4 \times 10^5$ e a média aritmética superior a $1,9 \times 10^4$ por grama (Tabela 1). Salienta-se que em ambas as Tabelas pode-se constatar que todas as porções positivas para coliformes fecais, também o foram para *E. coli*.

Comparando-se os resultados obtidos com relação aos NMP de coliformes fecais com os parâmetros adotados pela legislação nacional, pode-se verificar que 30 (61,2%) das amostras analisadas, encontram-se fora dos valores permitidos, pelos padrões adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, os quais toleram no máximo a presença de 3×10^2 dessas bactérias indicadoras de poluição fecal por grama de produto.

Os padrões de alimentos portugueses (22) exigem para carnes retalhadas a ausência de *E. coli* em 0,1g do alimento, o que poderia ser interpretado como sendo 10/g. A este respeito, pode-se verificar na Tabela 2 que, levando-se tal parâmetro em conta, apenas 2 (4,1%) amostras poderiam ser consideradas próprias ao consumo.

Quanto à presença de patógenos como o *Staphylococcus aureus* em alimentos crús, a sua importância estaria ligada ao fato de que, durante sua multiplicação no alimento, algumas cepas, ao serem ingeridas juntamente com o produto, poderiam vir a produzir uma toxina capaz de provocar um quadro de gastrite. É importante lembrar que mesmo após um processo normal de coccção, onde os microrganismos podem ser distribuídos, devido a sua alta termorresistência, a enterotoxina previamente produzida no alimento poderá permanecer ativa.

Segundo Mossel & Tarr (20), se altos níveis de cepas enterotoxigênicas de *S. aureus*, como por exemplo, 10^6 por grama ou mais, estiverem presentes no alimento, este pode ser considerado perigoso quanto a possibilidade de causar quadro de intoxicação ao consumidor. A este respeito, Hobbs (11) considera que para provocar sintomas de intoxicação estafilocócica no homem, o alimento deve conter por grama, de 5×10^5 a 10^6 ou mais de *S. aureus* produtor de enterotoxina. Entretanto, a sua presença nos alimentos e seu número vão depender, substancialmente, da microflora competitiva presente. Segundo Troller & Frazier (27), os estafilococos têm dificuldades em competir com outros microrganismos comumente presentes nos alimentos frescos ou congelados. Tais germes saprófitas competiram quanto a utilização de elementos nutritivos, além do fato dessas bactérias, através da produção de metabólitos inibidores, tornarem as condições ambientais desfavoráveis ao crescimento de *S. aureus*. Noskova (21), refere que bactérias tais como *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Proteus vulgaris*, coliformes e lácticas, que normalmente se encontram presentes nas carnes, podem interferir na multiplicação do

S. aureus com outros microrganismos depende da composição meio ou alimento, pH, temperatura, assim como o número inicial dessa bactéria e a proporção em que os demais agentes microbianos se encontram no produto. Se as condições favorecem o crescimento do *S. aureus*, as outras bactérias serão inibidas ou vice-versa. Se em produtos cárneos refrigerados estiver presente a enterotoxina estafilocócica, isto se deve, provavelmente, a sua produção antes ou após a saída do alimento da câmara fria, pois em temperatura de refrigeração não ocorre a produção desse produto tóxico.

Di Giacinto & Frazier (6), mostraram o efeito inibidor sobre os estafilococos, exercidos por bactérias coliformes, *Proteus* sp., *E. coli* e bactérias que normalmente fazem parte da microflora contaminante de alimentos crus. Afirmando, ainda, que se as condições forem adequadas ao crescimento destes germes, assim como de outras bactérias presentes no alimento, essas poderão inibir o crescimento do *S. aureus*. Normalmente, o *S. aureus* mostra-se nos alimentos em menor número que seus competidores, fato este que auxilia a inibição do seu crescimento por parte da microflora contaminante.

Casman e cols. (3) estudaram o crescimento do *S. aureus* e a produção de enterotoxina em carnes cruas e cozidas. Observaram que em carnes cruas, tanto o crescimento como a produção de enterotoxina eram inferiores aos da carne cozida, fato este atribuído, pelos autores, à microflora existente na carne crua.

Graves & Frazier (8), trabalhando com vários alimentos verificaram que as bactérias contaminantes presentes no produto exerciam ação inibidora ou estimuladora do crescimento do *S. aureus*. Estes efeitos, porém, eram mais evidentes à temperatura de 15°C, principalmente o exercido por bactérias pertencentes ao gêneros *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Alcaligenes* e a espécie *Proteus vulgaris* possuidoras de efeito inibidor mais acentuados.

MacCoy & Faber (18) pesquisaram a influência de alguns microrganismos presentes em vários tipos de carnes sobre o crescimento de *S. aureus* e a produção de enterotoxina estafilocócica. Concluíram que frequentemente pode ocorrer inibição do crescimento da bactéria ou da produção de enterotoxina. A primeira poderia ser decorrente da formação de substâncias inibidoras e a segunda, ocorreria, provavelmente, como resultado da competição por parte da microflora presente, por alguns nutrientes essenciais à formação de enterotoxina.

Em nosso meio, Delazari e cols. (5) estudaram, em linguiças, o efeito inibidor da microflora contaminante sobre o desenvolvimento de *S. aureus*. Entre as bactérias estudadas, as psicrófilas e as bactérias lácticas foram as que apresentaram maior efeito inibidor sobre o *S. aureus*, sendo que as contagens desta bactéria não ultrapassaram de 10^5 por grama, mesmo em amostras artificialmente contaminadas.

Os resultados obtidos no presente estudo, concordam com os verificados nas pesquisas dos autores citados, os quais procuraram relacionar o efeito inibidor da microflora contaminante, principalmente em carne crua, sobre o crescimento do *S. aureus*. Assim, ao analisar-se as Tabelas 1 e 2, observa-se o alto índice de contaminação verificado nas amostras de fígado examinadas. De acordo com a Tabela 2 nota-se que as contagens de bactérias psicrófilas e mesófilas, 52% e 100% das amostras estudadas, respectivamente, revelaram-se com valores iguais ou superiores a 10^5 por grama do produto. Em relação aos coliformes, em 96% das amostras os NMPs foram iguais ou superiores a 10^3 por grama, enquanto que 43% mostraram-se com número de coliformes fecais, ou de *E. coli* igual ou superior a 10^3 por grama. Quanto ao número de *S. aureus* presentes, (Tabela 3) 10% das amostras continham 10^4 desta bactéria por grama. É importante salientar que após o cozimento da carne, onde a maior parte da microflora contaminante é destruída, se o *S. aureus*, mesmo em pequeno número, permanecer viável e se as condições intrínsecas do alimento forem adequadas ao crescimento, esta bactéria poderá multiplicar-se rapidamente. Nestas

Tabela 3 - Distribuição das 50 amostras de fígado de bovino analisadas segundo o número de *Staphylococcus aureus* por grama

Nº/Grama	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	Nº	%
<50	31	62,0
50 - 10^2	1	2,0
10^2 - 10^3	5	10,0
10^3 - 10^4	8	16,0
10^4 - 10^5	5	10,0
Total	50	100,0

condições não estaria sofrendo a competição de outras bactérias e, sendo enterotóxico, poderá produzir enterotoxina estafilocócica no produto já pronto para ser consumido.

No presente experimento, analisando-se a Tabela 3, nota-se que a contagem mínima obtida para *S. aureus* foi menor que 50 por grama de fígado de bovino, enquanto que a contagem máxima foi de 5×10^4 por grama, sendo a média aritmética menor do que $2,5 \times 10^3$ por grama. Pode-se observar que o número máximo de *S. aureus* obtido mostra-se, segundo Hobbs (11) e Mossel & Tarr (20), abaixo do valor necessário para produzir enterotoxina na estafilocócica em quantidade suficiente para causar uma intoxicação alimentar.

Consultando-se os padrões bacteriológicos portugueses para alimentos (22), verificamos que para carnes vendidas em retalho deve existir ausência de *S. aureus* em 0,01 grama do produto. Comparando-se os valores obtidos com relação a *S. aureus* com os padrões portugueses, verifica-se que 18 (36%) das amostras de fígado de bovino analisadas poderiam ser consideradas impróprias ao consumo. Por outro lado, fazendo-se o mesmo confronto como os padrões microbiológicos vigentes no Estado de Massachusetts, e citados por Jay (15), 19 (38%) das amostras seriam condenadas por este padrão, que não permite a presença de *S. aureus* em carnes cruas. Deve-se ressaltar, porém, que as amostras com 50 *S. aureus* por grama, foram consideradas como sendo negativas e, assim sendo, levando-se em conta este último padrão, o número de amostras que seriam consideradas impróprias ao consumo seria maior.

Na presente investigação, 19 (38%) das 50 amostras de fígado de bovinos analisadas, revelaram-se positivas para *S. aureus*, proporção esta inferior a obtida por Cerqueira-Campos (4) em carne moída, onde a positividade por *S. aureus* atingiu 44%. O índice de contaminação foi, também, inferior ao obtido por Jay (14) que ao analisar amostras de fígado de bovinos, constatou positivamente para *S. aureus* em 54%. Em 1962, o mesmo autor (13) repetindo este estudo, porém trabalhando com fígado de bovino e de suíno, isolou *S. aureus* de 42% das amostras de fígado de bovino e de 71% das de fígado de suíno.

Conclusões

- Para as 50 amostras de fígado de bovino analisadas, quanto às contagens de bactérias psicrófilas aeróbias ou facultativas, 6 (12%) das amostras apresentaram valores iguais ou superiores a 106 grama, podendo ser considerados altos.
- Para as contagens de bactérias mesófilas aeróbias ou facultativas, 29 (58%) amostras apresentaram valores acima do máximo permitido (3×10^6 grama) pelo padrões adotados pela Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.
- Quanto a bactéria coliformes totais, 48 (96%) amostras apresentaram resultados superiores a um NMP de 10^3 grama.
- Com, relação ao NMP de bactérias coliformes fecais e, em particular, *E. coli*, observa-se que 19 (38,8%) do total de amostras examinadas apresentaram-se dentro dos padrões adotados pela Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, que toleram a presença dessas bactérias de no máximo 3×10^2 grama do alimento.
- Para as contagens de *S. aureus* 5 (10%) amostras revelaram-se com valores iguais ou superiores a 10^4 grama.

Referências Bibliográficas

- American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 12ed. New York, 1965.
- American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 14ed. Washington D.C., 1975.
- Gasman, E.P.; McCoy & Brandy, P.J. - Staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. Appl. Microbiol., 11:498-500, 1963.
- Cerqueira-Campos, M.L. - *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e bactérias do gênero *Salmonella* em carne moída, vendida no Município de São Paulo (1976/1977), Universidade de São Paulo USP, Instituto de Ciências Biomédicas, 1983).

5. Delazari, I.; Leitão, M.F.F. & Hsu, L.A. - Efeito da microflora contaminante sobre o desenvolvimento de *Staphylococcus aureus* em linguiças. Col. Inst. Tec. Alim., 8:577-571, 1977.
6. Di Giacinto, J.Y. & Frazier, W.C. - Effect of coliform and *Proteus* bactéria on growth of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 14:124-129, 1966.
7. Gardner, G.A. - A note on the aerobic microflora of fresh and frozen porcine liver stored at 5°C. J. Food. Technol., 6:225-231, 1971.
8. Graves, R.R. & Frazier, W.C. - Food microorganisms influencing the growth of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 11:513-16, 1963.
9. Hanna, M.O.; Smith, G.C.; Savell, J.W.; McKeith, F.K. & Vanderzant, C. - Microbial flora of livers, kidneys and hearts from beef, pork and lamb: effects of refrigeration freezing and thawing. J. Food. Prot., 45:63-73, 1982.
10. Harrigan, W.F. & McCancer, M.E. - Laboratory methods in food and dairy microbiology. London, Academic Press, 1976.
11. Hobbs, B.C. - Staphylococcal and *Clostridium welchii* food poisoning. In: Food poisoning. Royal Society of Health, London, p.49-59, 1962.
12. International Commission on Microbiological Specifications for Foods - Microorganisms in food. 1 Their significance and methods of enumeration. 2ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
13. Jay, J.M. - Further studies on staphylococci in meats. III - Occurrence and characteristics of coagulase-positive strains from a variety of nonfrrozen market cuts. Appl. Microbiol., 10:247-251, 1962.
14. Jay, J.M. - Incidence and properties of coagulase-positive staphylococci in certain market meats as determined in there selective media. Appl. Microbiol., 9:228-232, 1981.
15. Jay, J.M. - Microbiologia moderna de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, 1978.
16. Lawrie, R.A. - Ciéncia de la carne. Zaragoza, Acribia, 1967.
17. Levine, M. Facts and fancies of bacterial indices in standards for water and foods. Food Technol., 11:29-38, 1961.
18. McCoy, D.W. & Faber, J.E. - Influence of food microorganisms on staphylococcal growth and enterotoxin production in meat. Appl. Microbiol., 14:372-377, 1966.
19. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária - Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos - Portaria nº 01, D.O. União, p.2197-2200, 28/01/87.
20. Mossel, D.A.A. & Tarr, H.L.A. - Significance of microrganisms in foods. In: Ayres, J.C. - Chemical and biological hazards in foods. Iowa, The Iowa State University Press, p.157-201, 1964.
21. Noskowa, G.L. - Microbiologia de las carnes conservadas por el frio. Zaragoza, Ed. Acribia, 1975.
22. Ribeiro, A.M.R. - Padrões bacteriológicos de alimentos portugueses. Rev. Microbiol., São Paulo, 5:17-25, 1974.
23. Secretaria de Estado da Saúde. Normas Técnicas Especiais Relativas a Alimentos e Bebidas - Norma Técnica nº 3. In: Regulamento da promoção, preservação e recuperação da saúde no campo de competência da Secretaria de Estado da Saúde - São Paulo, p.153-154, 1979.
24. Shelef, L.A. - Microbial spoilage of fresh refrigerated beef liver. J. Appl. Bact., 39:273-280, 1975.
25. Thatcher, F.S. & Clark, D.S. - Analysis microbiologico de los alimentos. Zaragoza, Ed. Acribia, 1973.
26. Thomason, B.M.; Cherry, W.B. & Doll, D.J. - *Salmonellae* in health foods. Appl. Env. Microbiol., 34:602-603, 1977.
27. Troller, J.A. & Frazier, W.C. - Repression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria. II: Causes of inhibition. Appl. Microbiol., 11:163-165, 1963.
- Witter, L.D. - Psychrophilic bacteria: a review. J. Dairy Sci., 44:983-1015, 1961.

OCORRÊNCIA DE PLASMÍDIOS EM LINHAGENS BACTERIANAS FIXADORAS ASSIMBIÓTICAS DE NITROGÊNIO

Gislene Garcia Franco do Nascimento
 & Flávio Cesar Almeida Tavares

Deptº de Genética ESALQ/USP

Caixa Postal 83

13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Foi feito um estudo dos genes envolvidos com o processo de fixação assimbiótica de N_2 , em populações bacterianas selvagens do solo, com o intuito de se verificar a ocorrência de genes nif plasmidiais, que pudessem ser transferidos para outros sistemas não fixadores. Foi observada a presença de plasmídios nos isolados naturais, 2-II, 5-3 e 40-1 com pesos moleculares de 64, 40 e 92 Md, respectivamente, revelados por eletroforese em gel de agarose. Em nenhuma destas linhagens, se detectou a presença de genes plasmidiais envolvidos com o processo de fixação de N_2 , uma vez que após a eliminação dos plasmídios com agentes de "cura", estas continuaram seu desenvolvimento normal em meio isento de nitrogênio incorporado. A maior porcentagem de eliminação de plasmídios foi conseguida através do tratamento com temperatura de 44°C (2 a 10%), seguida do tratamento com brometo de etídio (1 a 5%), sendo menores as obtidas com acriflavina (0,5 a 1%) e acridina laranja (0,2 a 0,8%).

Summary

Detection of bacteria plasmids in non-symbiotic fixer strain

In soil bacteria plasmidial and chromosomal genes related to N_2 fixation were screened and selected for genetic studies and also to evaluate their transfer potential to other biological systems. The presence of plasmids were detected in the natural isolates 2-II, 5-3 and 40-1 with molecular weight 64, 40 and 92 Md respectively, determined by agarose gel electrophoresis. None of these strains had plasmidial fixation genes since after plasmidial elimination ("cure") growth remained normal in media without nitrogen. Best plasmid "cure" was obtained after 44°C temperature treatment (2-10%) followed by ethidium bromide (1-5%) and the lowest elimination was obtained by acriflavin (0,5-1%) and acriidine orange (0,2-0,8%).

Introdução

A ocorrência de plasmídios tem sido descrita em várias espécies de bactérias fixadoras assimbióticas de N_2 , tais como *Azospirillum*, *Azotobacter* e *Beijerinckia*. Foi observada a presença de um a cinco plasmídios (4, 5) em várias linhagens de *Azospirillum* com peso molecular variando de 3,5 a 300 Md. Nestes casos, nenhuma relação entre os plasmídios e as propriedades fenotípicas, em especial a fixação de N_2 , ficou estabelecida. Foi também verificada a perda de alguns plasmídios

espontaneamente e através de tratamento com agentes de "cura" como temperatura de 44°C e acridina laranja. Alterações fenotípicas, tais como utilização de glicose e resistência a metais pesados foram notadas em alguns ensaios (3). Uma exceção a estes casos foi observada em *A. brasiliense*, que não foi capaz de fixar N₂, após a perda dos dois plasmídios (65 e 125Md) no tratamento com acriflavina e acridina laranja (10).

Várias espécies de *Azotobacter*, como *A. chroococcum*, *A. vinelandii*, *A. beijerinckii* e *A. paspali* foram avaliadas quanto à presença de plasmídios (14). A maioria delas continham plasmídios de 10 a 100Md, exceto para *A. vinelandii* O e OP que não continham nenhum. Uma linhagem de *A. chroococcum* apresentou cinco plasmídios com 7, 45, 50, 80 e 115Md. Estas espécies não apresentaram resistência a metais ou antibióticos e não foi verificado antagonismo com outras espécies de *Azotobacter*, com relação à produção de bacteriocinas ou fagos. Algumas destas, perderam o plasmídio após tratamento com acriflavina e continuaram a fixar N₂.

Em vista destes fatos, procurou-se neste trabalho isolar linhagens bacterianas do solo portadoras de plasmídios, contendo genes relacionados com o processo de fixação de N₂, que pudessem ser posteriormente transferidos para outros sistemas não fixadores.

Material e Métodos

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho, bem como sua procedência, estão descritas na Tabela 1. Além das linhagens bacterianas fixadoras de nitrogênio cedidas por vários laboratórios, isolou-se outras a partir de amostras de solos. Para isto, foram utilizados solos de várias procedências (Piracicaba, Botucatu e São Carlos) com características físico-químicas diferentes. Nesta seleção, utilizou-se o método proposto por Norris & Ribbons (13) e a verificação da ocorrência de plasmídios nestas linhagens, foi realizada através de dois métodos de eletroforese em gel de agarose (7, 15). Foi feita a estimativa dos pesos moleculares dos plasmídios das amostras bacterianas, de acordo com o método de Meyers & col. (12). Este se baseia na comparação da migração em eletroforese em gel

Tabela 1 - Linhagens bacterianas fixadoras de N₂, utilizadas neste trabalho

Linhagem	Procedência
<i>Azospirillum brasiliense</i> - sp 7	Centro de Biotecnologia, Universidade Federal, RS
<i>Azotobacter vinelandii</i> - ATC 478	Seção de Microbiologia do Solo, CENA/USP
<i>Azotobacter vinelandii</i> - OP	Seção de Microbiologia do Solo, CENA/USP
<i>Azotobacter chroococcum</i>	Seção de Microbiologia do Solo, CENA/USP
Isolados do gênero <i>Azotobacter</i> 80-IV 40-1 22-II	Laboratório de Microbiologia do Solo, Deptº de Solos, Geologia e Fertilizantes, ESALQ/USP
Isolados do gênero <i>Beijerinckia</i> 80-2 III 22-1 74-1 IAM 40-1 IV	Laboratório de Microbiologia do Solo, Deptº de Solos, Geologia e Fertilizantes, ESALQ/USP
Isolados do gênero <i>Azotobacter</i> 20-AM 12B 5-3 9 22	Este trabalho.
Isolado do gênero <i>Azospirillum</i> 13-2	Este trabalho.

de agarose dos plasmídios em estudo, com a migração de plasmídios de pesos moleculares já conhecidos, sendo utilizadas linhagens padrões de *Escherichia coli*.

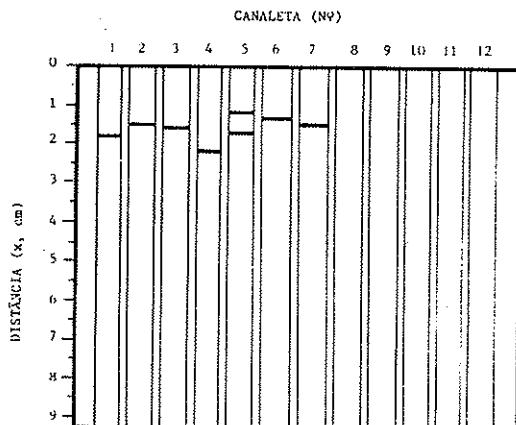
As linhagens que comprovadamente mostraram a presença de plasmídios, foram submetidas aos tratamentos com agentes de "cura", com a finalidade de se eliminar estes plasmídios. Neste processo, culturas de linhagens portadoras de plasmídio foram semeadas em meio líquido contendo concentrações variando de 2 a 50 µg/ml de brometo de etidio, acridina laranja ou acriflavina. Após 24 horas de incubação a 30°C, foram selecionadas as culturas que se desenvolveram em concentrações subinibitórias dos agentes citados. No caso do tratamento pelo calor, as culturas foram semeadas em meio líquido e incubadas a 44°C por 24 horas. A seguir, as colônias foram ensaiadas para se verificar a possível presença de células *nif*⁻ (incapazes de fixar N₂), utilizando-se a técnica da réplica em veludo (9), para meios com e sem nitrogênio incorporado. A comprovação da perda dos plasmídios foi feita através da eletroforese em gel de agarose. A porcentagem de eliminação foi calculada como o número de colônias que eliminaram o plasmídio, em relação ao total de colônias submetidas ao tratamento. Nos casos onde se conseguiu este intento, as células foram posteriormente ensaiadas para a verificação de uma possível alteração no processo de fixação de N₂, pela verificação do seu crescimento em meio sem nitrogênio incorporado.

Tabela 2 - Porcentagem de eliminação de plasmídios através do tratamento com agentes de "cura" em linhagens fixadoras de N₂. Símbolos: * = 90-100 colônias em cada tratamento

Amostras	Tratamento*			
	Brometo de etidio	Acriflavina	Acrídina laranja	Calor
<i>A. brasiliense</i>	1,08	0,42	0,43	2,03
	40-1	3,52	0,43	10,30
	5-3	5,51	1,03	0,23
	2-II	4,60	1,52	0,83
				8,87

Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose de isolados bacterianos fixadores assimbióticos de N₂ e linhagens portadoras de plasmídios, com pesos moleculares conhecidos (canaletas 3, 4, 5, e 7).

Canaleta	Linhagem	Peso Molecular (MD)
1	5-1	40*
2	2-II	64*
3	Rldrd19	62
4	Sa	23
5	sp7	125 e 65
6	40-1	92*
7	p307	54



Resultados e Discussão

A Figura 1 mostra o padrão de migração eletroforética das linhagens bacterianas que apresentaram plasmídios. Nas demais amostras não foram observados plasmídios em nenhum dos métodos de eletroforese realizados. Através da reta de padronização (Figura 2) foi possível estimar o peso molecular dos plasmídios das amostras 2 - 2II, 5-3 e 40-1 como sendo 64, 40 e 92MD, respectivamente. Pode-se observar que a presença, assim como o tamanho dos plasmídios presentes, não foi uma constante, pois variaram com a espécie, mostrando a grande variabilidade genética deste material.

Considerando a possibilidade de que algumas linhagens fixadoras de N₂ pudesssem

apresentar plasmídios não visíveis em eletroforese (devido ao pequeno número de cópias), fez-se o tratamento com cloranfenicol numa tentativa de amplificar o número de cópias destes plasmídios (15). Verificou-se que após este tratamento, apenas a linhagem 40-1 mostrou a presença de um plasmídio, o que não havia ocorrido antes do tratamento. No processo de amplificação, o plasmídio continua a replicar independente da replicação chromossônica, e desta forma, o número de cópias por célula aumenta, facilitando a visualização eletroforética (2). Deve ser salientado que os isolados 74-1, 40-1IV e LAMS, não foram submetidos à eletroforese, pois houve muita dificuldade em se retirar a espessa camada de muco que os envolvia dificultando a ocorrência de lise celular. Foi feita uma tentativa de eliminação deste muco com solução de EDTA, o que não teve sucesso.

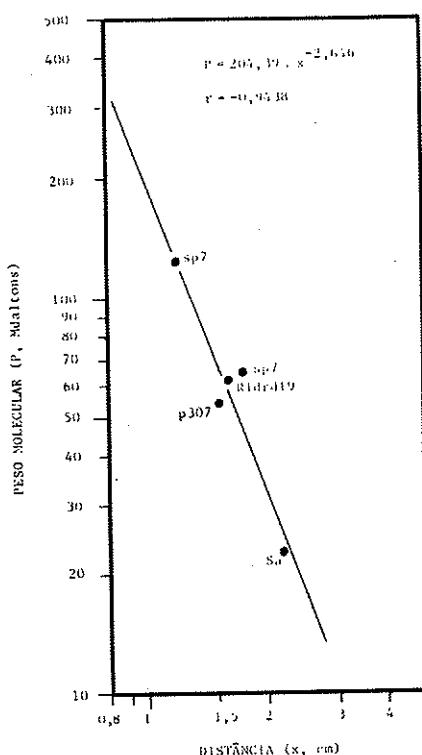
Cerca de 1.500 colônias foram ensaiadas quanto à capacidade de fixar nitrogênio após o tratamento com agentes de "cura" e os dados referentes a estes experimentos estão na Tabela 2. Entre as linhagens que apresentaram plasmídios, não se detectou a presença de genes plasmidiais envolvidos com o processo de fixação de N₂. Isto foi comprovado pelo fato de que após a eliminação destes plasmídios com agentes de "cura", estas linhagens continuaram a ter desenvolvimento normal em meio isento de nitrogênio incorporado. Isto está de acordo com os dados obtidos por Kennedy e col. (8) e Robson (14) que também não encontraram relação entre os plasmídios observados nas várias espécies de *Azotobacter* e *Beijerinckia*, com o processo de fixação de N₂. Uma exceção a estes casos foi observada com as linhagens de *A. brasiliense* Sp 7 que teve alterada a sua capacidade de fixação de N₂, ao perder seus dois plasmídios, fato este também verificado anteriormente por Lemos (10).

Pode-se observar na Tabela 2, que para estas linhagens estudadas, a maior porcentagem de eliminação de plasmídios foi conseguida através do tratamento com calor (variação de 2,03 a 10,3%), seguido do tratamento com brometo de etídio (variação de 1,08 a 5,5%). Os tratamentos com acriflavina e acridina laranja foram menos eficientes, resultando em perdas de plasmídios que variaram de 0,52 a 1,03 e 0,23 a 0,83%, respectivamente.

A perda de plasmídios pela ação do calor não está bem esclarecida, mas várias explicações têm sido propostas. De acordo com May & col. (11), a perda de resistência a tetraciclina e penicilina conferida por genes plasmidiais em *S. aureus* foi devida a uma menor taxa de replicação dos plasmídios a 44°C do que a da própria célula; sob estas condições, o número de plasmídios se torna tão reduzido após algumas horas de crescimento, sendo inclusive herdados de modo irregular, onde algumas células nem apresentam estes elementos. No entanto, para Asheshov (1), o calor apenas refletiu um aumento na taxa normal de perda espontânea de plasmídios que ocorre em longos períodos de estocagens. Zurkowsky (16), atribui a perda de plasmídios por calor em *R. trifolii* ao fato de que algumas funções replicativas codificadas por genes plasmidiais serem temperaturas-sensíveis.

O brometo de etídio como é sabido, se intercala entre pares de bases de DNA, interferindo na ação da DNA e RNA polimerase (6).

Figura 2 - Reta de calibração para estimativa dos pesos moleculares de plasmídios a partir de linhagens padrões



Referências Bibliográficas

1. Asheshov, E.H. - Loss of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* resulting from growth at higher temperature. *J. Gen. Microbiol.*, 42:403-410, 1966.
2. Clewell, D.B. - Nature of Col El plasmid replication in *Escherichia coli* in the presence of chloramphenicol. *J. Bacteriol.*, 110:667-676, 1972.
3. Elmerich, C. - *Azotobacter* and *Azospirillum* genetics and molecular Biology. In: Subba Rao, N.S., ed. - Currents developments in biological nitrogen fixation. Oxford, IBH publishing Co., New Delhi, p.315-346, 1984.
4. France, C. & Elmerich, C. - Physiological properties and plasmid content of several strains of *Azospirillum brasiliense* and *A. lipoférum*. *An. Microbial Inst. Pasteur*, 132A:3-17, 1981.
5. France, C.; Rosenberg, C.; Quiviger, B. & Elmerich, C. Plasmid and bacteriophages of *Azospirillum*. *Soc. gen. Microbiol. Quart.*, 8:136, 1981.
6. Johnston, J.H. & Richmond, M.H. - The increased rate of loss of penicillinase plasmids from *Staphylococcus aureus* in the presence of rifampicin. *J. Gen. Microbiol.*, 60:137-139, 1970.
7. Kado, C.I. & Liu, S.T. - Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145:1365-1373, 1981.
8. Kennedy, C.; Cannon, F.; Dixon, M. & Postgate, J.R. Recent advances in the genetics and regulation of nitrogen fixation. In: Kennedy & col., Current perspectives in nitrogen fixation. Elsevier, p.146-156, 1981.
9. Lederberg, J. & Lederberg, E.M. - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63:399-406, 1952.
10. Lemos, M.V.F. - Estudos genéticos no microrganismo fixador do nitrogênio *Azospirillum brasiliense*. Ribeirão Preto, 1980. (Tese de Doutoramento).
11. May, J.W.; Houghton, R.H. & Perret, C.J. - The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.*, 37:157-169, 1964.
12. Meyers, J.A.; Sanches, D.; Elwell, L.P. & Falkow, S. - A simple agarose electrophoresis method for identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127:1529-1537, 1976.
13. Norris, J.R. & Ribbons, D.W. - Methods in Microbiology. vol. 3A - Academic Press, London., p.795, 1970.
14. Robson, R.L. - Detection and function of indigenous plasmids of *Azotobacter*. *Soc. Gen. Microbiol. Quart.*, 8:136-137, 1981.
15. Santos, D.S. & Affonso, M.H.T. - 1º Curso avançado sobre biologia molecular de plasmídios bacterianos - guia de trabalhos práticos. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1982.
16. Zirkowski, W. Molecular mechanism for loss of nodulation properties of *R. trifolii*. *J. Bacteriol.*, 150:999-1007, 1982.

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E MORBIIDADE DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE NO ESTADO DE SÃO PAULO

Sergio Di Camilo Fava

Rua Oscar Freire, 2549
05409 São Paulo SP, Brasil

Celeste Fava Netto

Rua Havaí, 292 - aptº 82
01259 São Paulo SP, Brasil

Elizabeth Oliveira da Costa

Faculdade de Medicina Veterinária da USP
Cidade Universitária São Paulo SP

Luiz Carlos Cuce

Av. Afonso Boero, 377
01254 São Paulo SP, Brasil

Resumo

A incidência da paracoccidioidomicose "doença" nos Municípios e nas Grandes Unidades do Estado de São Paulo é analisada segundo a procedência de 937 doentes. Dos 571 Municípios do Estado de São Paulo, 212 apresentaram casos da moléstia. Estes 212 Municípios estão distribuídos sobre todas as Grandes Unidades do Estado indicando a endemicidade da doença em toda a área estadual. A pesquisa indicou que existem diferenças marcantes entre os Municípios quanto à incidência da paracoccidioidomicose "doença". As diferenças não são tão marcantes quando calculadas as incidências para as Grandes Unidades do Território paulista. Os principais fatores determinantes da paracoccidioidomicose doença, referentes ao parasita, ao hospedeiro e ao meio ambiente são discutidos. Os dados da pesquisa conduzem à conclusão de que a "reservária" ou "nicho ecológico" da paracoccidioidomicose pode situar-se em pequenas áreas, talvez menores do que as dos Municípios.

Summary

Geographical distribution and morbidity rate of paracoccidioidomycosis in São Paulo State Brazil

The incidence of paracoccidioidomycosis "disease" in the counties and Great Territorial Units of São Paulo State was analysed according the origin of 937 patients. From a total of 571 Counties, 212 presented cases of the disease. These counties are distributed all over the State area, indicating that the disease is endemic all over the State. The incidence differences are great among the Counties and less marked among the Great Units. Comments were made about the main factors influencing the paracoccidioidomycosis "disease", the microorganism, the ahost and ambiental factors. The findings of this research indicate the probability for the "reservaria" or "ecological niche" of *Paracoccidioides*

brasiliensis to be situated in small or more restrict areas than that of a County.

Introdução

A epidemiologia da paracoccidioidomicose pode ser abordada segundo diversos critérios:

1. *Procedência de doentes* - São numerosas as publicações, referentes a este tópico, nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Goias (7).

2. *Provas sorológicas* - Excepcionalmente a epidemiologia da paracoccidioidomicose pode ser abordada sob este aspecto (7).

3. *Reações intradérmicas* - Indiscutivelmente a reação intradérmica à paracoccidioidina é a arma mais eficiente na epidemiologia por ser capaz de evidenciar todas as formas da paracoccidioidomicose, com exceção daquelas que ocorrem em deficientes imunológicos. De todas as publicações que tratam da epidemiologia da paracoccidioidomicose, abordada através da prova intradérmica, as que abordaram aspectos importantes ou que trazem revisões amplas estão citadas na tese de mestrado defendida por Fava (7) junto à Escola Paulista de Medicina.

Tal tese trata da epidemiologia da paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo, abordada através da procedência dos doentes. A divulgação, mais ampla, dos dados ali referidos, foi considerada de utilidade e constitui o objeto desta publicação.

Material e Métodos

1. *Pacientes* - Foram estudados 937 pacientes de "paracoccidioidomicose doença", cadastrados, de 1953 a 1978, no fichário particular do Prof. Fava Netto, quando exercia suas atividades na Faculdade de Medicina da USP. O diagnóstico nestes pacientes foi realizado através de exames, clínicos e complementares, micológicos e imunológicos. Nem todos os pacientes possuíam todos os dados dos exames acima referidos mas apresentavam a forma "doença" da paracoccidioidomicose e referências seguras quanto às suas procedências. O objetivo do trabalho é o de analisar somente o aspecto paciente e procedência, se bem que, na epidemiologia da paracoccidioidomicose outros aspectos como: paciente e idade; paciente e sexo; paciente e raça; paciente e profissão; paciente e área de procedência (urbana ou rural) são importantes. Estes outros aspectos, no entanto, foram desenvolvidos por outros pesquisadores.

2. *Distribuição geográfica no Estado de São Paulo* - A distribuição geográfica dos pacientes foi feita por Municípios do Estado de São Paulo.

Dos 571 Municípios, 212 apresentaram a ocorrência da moléstia.

Segundo Antunes (2), o Estado de São Paulo, situado entre 20 e 25° de latitude Sul, cortado pelo trópico de Capricórnio, possui a maior parte de suas terras em planaltos, não apresentando grandes variações climáticas. Com temperaturas médias de 18 a 22°C, poucas vezes é assolado por geadas ou longas estiagens. Apresenta vastas extensões de solos arenosos e argilosos e áreas de solo eruptivo (terrás roxas).

Segundo o mesmo autor, o Estado de São Paulo pode ser subdividido em quatro grandes unidade de relevo, cujas características principais estão resumidas na Tabela 1.

A Figura 2 representa o Estado de São Paulo com suas grandes unidade do relevo, assim classificadas:

a. *Baixadas e bacias* - Altitude até 200m. Compreende o litoral e alguns Municípios do Vale do Paraíba. Os Municípios desta grande unidade que apresentaram casos de paracoccidioidomicose "doença" foram 9, 4 das Baixadas e 5 das Bacias.

b. *Planalto cristalino* - Altitude de 800 a 1.200m e Sub-Região de altitude acima de 1.200m. Os Municípios que apresentaram casos da moléstia foram 56 no Planalto Cristalino e 10 na Sub-Região.

Tabela 1 - Características da grandes unidades do Estado de São Paulo

Unidades	Altitude	Temperatura	Chuvas-média anual	Especificações
Litoral Norte, Central e Sul	até 200m.	Média acima de 23°C De inverno 17 a 19°C De verão 26 a 28°C	2.500 a 3.100mm	6% da área do Estado. Formação de restingas, praias, lagoas, barragens, falésias, mangues e dunas. Massas de ar: Tropical atlântica-ondas de calor. Polar atlântica-ondas de frio
Planalto Cristalino ou Ocidental Sub-região	800 a 1.200mm acima de 1.200mm	Média abaixo de 20°C	Acima de 3.000mm Exceção: Bacia de São Paulo e Vale do Paraíba - 1.250mm	Menos de 20% da área do Estado. Compreende Serra do Mar, Serra da Mantiqueira, Bacia de São Paulo e Calha do Vale do Paraíba. Massas de ar: Tropical atlântica. Polar atlântica.
Depressão Periférica	400 a 800m.	Média ao Norte 23°C ao Sul 19°C	1.250mm violentas de outubro a março. Estiagem acentuada no inverno	13% da área do Estado. Área deprimida situada entre os Planaltos Cristalinos e Sedimentar.
Planalto Sedimentar ou Ocidental	200 a 400m	Média de verão 25 a 27°C	1.200mm de outubro a março	61% da área do Estado. A maior parte encontra-se dentro da exceção climática dos vales dos grandes rios: Grande, Paraná, Paranaíba e Aguapeí. Massas de ar: Equatorial, Continental Polar atlântica.

c. Depressão periférica - Altitude de 400 a 800m. Os Municípios que apresentaram casos de moléstia foram 28.

d. Planalto sedimentar - Altitude de 200 a 400m. Os Municípios que apresentaram casos da moléstia foram 109.

Para a localização dos Municípios dentro das grandes unidades do relevo paulista foi utilizado mapa do Estado de São Paulo, com seus Municípios delimitados, sobre o qual foram traçadas as linhas delimitantes das grandes unidades. É preciso salientar que os Municípios localizados na Sub-região do planalto cristalino, conforme as Figuras de Antunes, podem não apresentar altitude acima de 1.200m. De qualquer modo, ficou delimitada pequena região do Planalto Cristalino, que demonstrou ser importante na discussão dos dados.

3. População - Considerando que os dados foram coletados de 1953 a 1978, resolveu-se tomar, como população de cada Município, a média das populações determinadas pelos recenseamentos de 1960 e de 1970, feitos respectivamente sete anos após o início e oito anos antes do término da coleta dos dados. Pensou-se que estas médias são representativas da população de cada Município. Os dados dos recenseamentos foram obtidos do IBGE sendo então calculados as médias populacionais.

Tais dados, em Tabelas, são encontrados na tese de mestrado de Fava (7), sendo impossível reproduzi-los no presente trabalho.

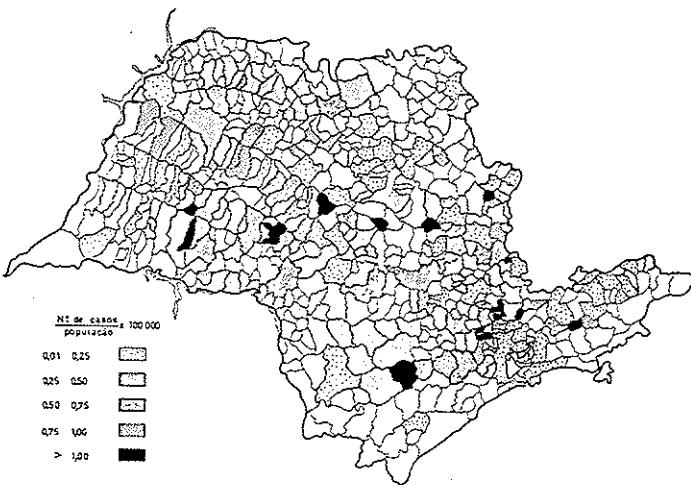
4. Índices epidemiológicos - Dos índices epidemiológicos segundo Anderson (1) foi utilizado o da Morbidade representado pela incidência - ambos os termos com a mesma definição.

Número de novos casos X 100.000/por ano

Número de habitantes.

Este índice é de real valor quando a moléstia é de notificação obrigatória o que não acontece com a paracoccidioidomicose. Neste caso o índice é de valor discutível.

Figura 1 - Incidência da paracoccidioidomicose doença por Municípios do Estado de São Paulo



Resultados

Como já referido, todos os Municípios do Estado de São Paulo que apresentaram a ocorrência de casos de paracoccidioidomicose "doença", devidamente localizados nas grandes unidades do relevo paulista, tiveram suas populações médias calculadas. Foram então, organizadas Tabelas com os nomes dos Municípios, a população média de cada um, o número de casos de paracoccidioidomicose ocorridos nos 25 anos em que foram levantados os dados, e os índices de incidência da moléstia. As Tabelas encontram-se na tese de mestrado já citada (7).

De tais Tabelas interessa citar que o menor índice de incidência da paracoccidioidomicose na região litorânea, reconhecidamente de baixa incidência e onde pequeno número de Municípios apresentaram casos da doença, foi verificado no Município de Santos (0,0394). O maior índice de incidência da moléstia foi verificado no Município de Bastos (2,5634) situado no planalto ocidental ou sedimentar.

A Figura 1 apresenta o mapa do Estado de São Paulo, com seus Municípios. Os Municípios onde não ocorreram casos de paracoccidioidomicose estão em branco. Aqueles em que ocorreram casos da moléstia se encontram representados de acordo com os seguintes índices de incidência:

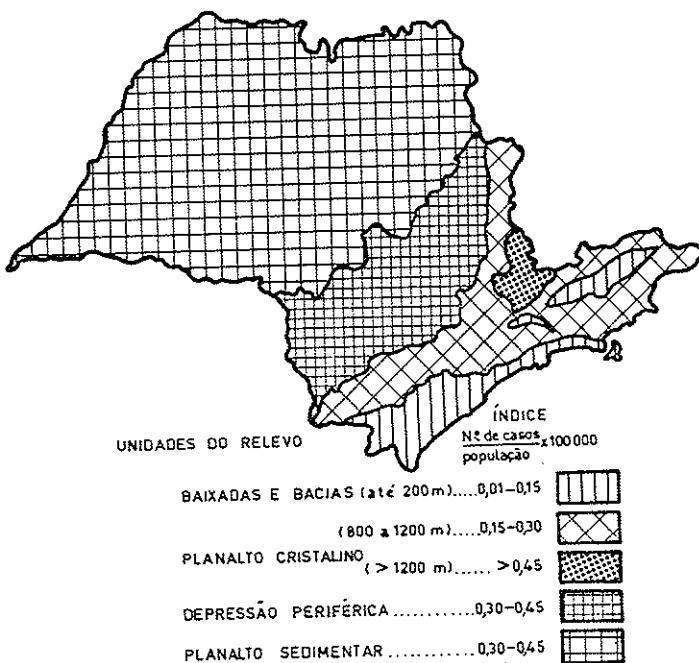
- de 0,01 a 0,25
- de 0,25 a 0,50
- de 0,50 a 0,75
- de 0,75 a 1,00
- acima de 1,00

Pode-se verificar pela Figura 1 que a grande região do relevo paulista que apresentou um grande número de Municípios em branco e na qual os índices de incidência, nos Municípios em que ocorreram casos da moléstia, são baixos, foi a das baixadas e bacias. Em todas as outras há Municípios com incidência alta, acima de 1,00.

Da distribuição dos Municípios pelas grandes unidades do relevo paulista foi possível extraírem-se as somatórias das populações, as somatórias dos casos da moléstia e dai calcular-se a incidência para cada grande unidade. A somatória da população é somente aquela dos Municípios que apresentaram casos da moléstia.

A Figura 2 representa a incidência da paracoccidioidomicose assim calculada para as grandes unidades do relevo paulista.

Figura 2 - Incidência da paracoccidioidomicose doença nas grandes regiões do relevo paulista



Os índices de incidência são crescentes na seguinte ordem: baixadas e bacias, planalto cristalino, depressão periférica e planalto sedimentar, estas duas com índices iguais. Verifica-se no entanto, que quando se delimitou a pequena área do planalto cristalino com maior altitude esta sub-região foi a que apresentou maior incidência da moléstia.

A análise da Figura 1 sugeriu, também, que poderia haver maior ocorrência nos Municípios situados sobre a linha limítrofe do planalto cristalino com a depressão periférica. A incidência total para tais Municípios não foi, no entanto, diferente daquelas verificadas para a depressão periférica e planalto sedimentar.

Discussão

A epidemiologia da paracoccidioidomicose é complexa. Particularmente quando abordada através da ocorrência de casos clínicos, onde todos os fatores interferentes merecem consideração (7). Ainda mais, por não ser moléstia de notificação compulsória não existem registros de casos da doença facil acesso, motivo pelo qual considerou-se de utilidade a divulgação dos dados aqui recolhidos.

Quanto aos fatores ligados ao parasita são clássicos os conhecimentos sobre a importância do número de micróbios e da sua virulência na produção da doença. Assim, na histoplasmose "infecção epidêmica" há, de regra, a ocorrência de sinais e sintomas que se acompanham das respostas imunes celular e humoral. Estes acontecimentos são atribuídos, neste caso, ao grande número de micróbios que atingem o hospedeiro. Na paracoccidioidomicose sabe-se da ocorrência da "infecção assintomática", mas quase nada sobre a ocorrência de "infecção sintomática". Na paracoccidioidomicose "doença" existem os casos de formas disseminadas agudas, que

ocorrem em indivíduos jovens que se curam de modo surpreendente com o tratamento, o que leva à suposição de ter sido a infecção ocasionada por grande número de micróbios ou por micrório de maior virulência. Isto venceria a resistência natural do hospedeiro com a disseminação da doença. Neste caso o tratamento, bem sucedido, indicaria que o paciente é normal e não deficiente imunológico.

Já foi demonstrado que é possível aumentar a virulência do *P. brasiliensis* por passagens sucessivas em animal suscetível (4). Em condições experimentais, fixando-se o número de micróbios viáveis que são injetados, é possível estudar a virulência diferente de cada amostra de *P. brasiliensis*. A virulência passa então a ser responsável pela patogenicidade. A patogenicidade diferente, de amostra para amostra pode estar relacionada com a composição química diferente da parede do fungo (17, 18). Por sua vez a composição química diferente da parede celular pode ser responsável pela demonstração de que a composição antigênica, também, é diferente de amostra para amostra (19). As determinantes antigênicas, presentes na parede do fungo, podem encontrar receptores específicos nas células do hospedeiro que facilitam a aderência, a penetração e a sua colonização no hospedeiro.

Não existem, ainda, estudos que procurem correlacionar a patogenicidade de amostras do *Paracoccidioides brasiliensis* segundo a procedência dos pacientes dos quais foram isoladas. Sabe-se, no entanto, que para determinadas áreas geográficas as manifestações clínicas da doença são diferentes.

Os fatores ligados ao hospedeiro parecem bem mais importantes na eclosão da paracoccidioidomicose "doença". O homem parece constituir-se no único animal suscetível à paracoccidioidomicose "doença" com excessão do caso descrito em macaco (10). O *P. brasiliensis* já foi isolado de tatus (*Taxidea novemcinctus*) (7). Dentro de sua suscetibilidade exclusiva a espécie humana é, no entanto, bastante resistente à "doença". Já a paracoccidioidomicose "infecção assintomática" é frequente na espécie humana atingindo 25% da população no Estado de São Paulo (8), e mais frequente ainda em outras espécies animais (6, 15).

A principal causa, determinante destas diferenças de suscetibilidade das espécies, parece ser a constituição genética. A ocorrência de mais de um caso de paracoccidioidomicose "doença" numa mesma família (9), aconteceu entre irmãos ou entre pais e filhos, que apresentam maior semelhança genética. Não aconteceu entre marido e esposa (9) apesar da maior exposição desta à infecção (8), pois, neste caso, a constituição genética diversa da esposa condicionou somente a paracoccidioidomicose "infecção". Na mesma linha de considerações podemos incluir as raças humanas. Acreditava-se que a raça amarela fosse mais suscetível à paracoccidioidomicose "doença". Os dados da presente pesquisa não excluem tal possibilidade. O Município de Bastos, situado no planalto sedimentar do Estado de São Paulo, foi o que apresentou o maior índice de paracoccidioidomicose "doença" (incidência de 2,5634) e todos os cinco pacientes procedentes deste Município eram japoneses.

As diferenças genéticas justificam as diferenças das espécies animais frente à infecção experimental. Os cães apresentam "infecção" sem "doença", os cobaias e os bovinos apresentam "doença" localizada que raramente se dissemina; os hamsters, os camundongos e *Proechimys guayanensis* apresentam disseminação da infecção. Estas diferenças genéticas, condicionando maior suscetibilidade à infecção experimental, ficam melhor caracterizadas quando são estudadas em linhagens isogênicas de camundongos (5).

Outro fator relacionado com o hospedeiro humano é representado por hormônios femininos. A paracoccidioidomicose "doença" acontece na proporção de 14,7 homens para 1 mulher (11) e segundo demonstração "in vitro" (16) os hormônios femininos inibem o crescimento do *P. brasiliensis*. Tais diferenças inexistem para as crianças (7).

A idade, que parece não ser importante quanto a paracoccidioidomicose infecção, exerce influência no aparecimento da paracoccidioidomicose "doença". Assim sabe-se que a paracoccidioidomicose doença é mais frequente acima dos 30 anos. É provável que ocorra, nestes casos, a recaída de complexo primário de infecção adquirida antes, como estão a sugerir os casos descritos na Europa e nos Estados Unidos em pacientes que viveram na zona endêmica da moléstia e que ficaram doentes muitos anos depois, vivendo em zona não endêmica. Nada se conhece quanto aos fatores que

condicionam tal ocorrência. Estas considerações são pertinentes pois indicam a relatividade dos dados aqui apresentados. Assim pacientes procedentes de determinado Município podem eventualmente ter adquirido a infecção em outro, através de uma visita, por exemplo.

Outros fatores condicionantes do aparecimento da paracoccidioidomicose "doença" podem estar relacionados ao meio ambiente.

Trabalho anterior (12) indica a ser "reservária" da paracoccidioidomicose situada em altitudes de 150 a 400 metros. A Figura 2 deste trabalho, indica que, quando são consideradas as grandes regiões do Estado de São Paulo, os índices de incidência da paracoccidioidomicose são baixos para altitudes de até 200m; praticamente iguais para altitudes de 200 a 800m, pouco menores para altitudes acima de 800m. O que ressalta dos dados, no entanto, é fato de que, uma vez delimitada uma pequena sub-região do planalto cristalino, que teria altitude superior a 1.200m, a incidência da paracoccidioidomicose "doença" foi maior do que em qualquer outra região.

Quanto a influência da temperatura, trabalho experimental (13, 14) demonstrou a sua importância na eclosão das lesões. As variações da temperatura no Estado de São Paulo não são grandes. São mais altas, médias anuais acima de 23°C, no Litoral e planalto sedimentar. No presente trabalho a incidência da paracoccidioidomicose foi diferente nestas grandes regiões. A depressão periférica que apresenta médias anuais de temperatura praticamente iguais às do planalto cristalino apresentou incidência da doença igual à verificada no planalto sedimentar. Para estas variações pequenas da temperatura esta pesquisa não indica diferenças quanto à incidência da paracoccidioidomicose doença.

Fator ambiental, que seria importante para a sobrevivência do *P. brasiliensis* no solo, é a umidade.

A ocorrência da paracoccidioidomicose doença correlacionada como este fator, foi salientada em pesquisas anteriores (3, 11 e 12). A "reservária" da paracoccidioidomicose situar-se-ia em regiões úmidas, próximas aos grandes rios, de matas, de solos férteis.

Os dados aqui apresentados revelam, no entanto, que muitos Municípios situados nos vales dos grandes rios como o Rio Grande e o rio Paraná não apresentaram casos de paracoccidioidomicose doença. A ocorrência foi muito baixa na região do Litoral onde a umidade é alta. Devido ao que se admite sobre a etiopatogenia da paracoccidioidomicose, é possível que a ocorrência de períodos alternados de umidade (chuvas) e de seca (estiagens com ventos) tenham maior importância na epidemiologia da doença.

Os dados da presente pesquisa revelam índices de incidência da paracoccidioidomicose doença, para o Estado de São Paulo, semelhantes aos já referidos na literatura (14) para o Brasil, Argentina e Paraguai.

Da análise dos dados ressalta o fato de que fatores ambientais não seriam suficientes para explicar maior ou menor incidência da paracoccidioidomicose "doença", quando considerados para grandes regiões. É possível que em regiões menores como as aqui apresentadas, Sub região do Planalto Cristalino e Municípios, quando analisadas quanto aos fatores ambientais possam conduzir à descoberta dos "níchos ecológicos" ou "reservária" da paracoccidioidomicose, além de melhor caracterizar a influência de tais fatores no aparecimento da paracoccidioidomicose "doença".

Referências Bibliográficas

1. Anderson, G.W. - The principles of epidemiology as applied to infectious diseases. In: - Dubos, R.Y. & Hirsch, Y.G. - Bacterial and mycotic infections of man. 4. ed. Philadelphia, Lippincot, p.886-912, 1965.
2. Antunes, C. - Geografia de São Paulo. 9.ed. São Paulo, Ed. do Brasil.
3. Bopp, C. & Bernardi, C.D.V. - Geopatologia da blastomicose sul-americana no Rio Grande do Sul. Hospital (Rio de Janeiro), 71:113-130, 1967; Rev. Med. R.G. Sul, 9:31-49, 1967.

4. Brito, T. & Fava Netto, C. - Disseminated experimental South American Blastomycosis of the guinea pig: a pathologic and immunologic study. *Pathol. Microbiol.*, 26:29-43, 1963.
5. Calich, V.L.G.; Burger, E. & Singer-Vermes, L.M. - Experimental paracoccidioidomycosis in isogenic strains of mice. I - Susceptibility to the fungus: dose effect. In: - Encontro sobre paracoccidioidomicose, 2, Botucatu, SP, Anais, p.6, 1983.
6. Costa, E.O. & Fava Netto, C. - Contribution to the epidemiology of paracoccidioidomycosis and histoplasmosis in the state of São Paulo, Brasil. Paracoccidioidin and histoplasmin intradermic test in domestic animals. *Sabouraudia*, 16:93-101, 1978.
7. Fava, S.Di C. - Contribuição à epidemiologia da paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1984. (Tese de Mestrado).
8. Fava Netto, C. & Raphael, A. - A reação intradérmica com polissacáride do *P. brasiliensis*, na blastomicose sul americana. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 3:161-165, 1961.
9. Fava Netto, C.; Castro, R.M.; Gonçalvez, A.P. & Dillon, N.L. - Ocorrência familiar da blastomicose sul-americana: a propósito de 14 casos. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 7:332-336, 1965.
10. Johnson, W.D. & Lang, C.M. - Paracoccidioidomycosis (South American Blastomycosis) in a squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Vet. Pathol.*, 14:368-371, 1977.
11. Londero, A.T. - Epidemiología. In: Del Negro, G.; Lacaz, C.S. & Fiorillo, A.M. - Paracoccidioidomicose: blastomicose sul-americana. São Paulo, Sarvier/EDUSP, 1982. p.85-90.
12. Londero, A.T.; Ramos, C.D.; Lopes, J.O. & Benevenga, J.P. - "Reservárea" da paracoccidioidomicose no Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 14:377-380, 1972.
13. Mackinnon, J.E. - Revisión sobre observaciones experimentales y humanas demonstrativas del efecto de la temperatura em algumas micoses. *Torax*, 13:266-270, 1964.
14. Mackinnon, J.E. - Geographical distribution and prevalence of paracoccidioidomycosis. In: - Pan American Symposium on paracoccidioidomycosis, 1, Medellin, Colombia, Proceedings. Washington, PAHO, 1972. (Scient. Publ. n° 254). p.45-51.
15. Mós, E.N. & Fava Netto, C. - Contribuição ao estudo da paracoccidioidomicose. I - Possível papel epidemiológico dos cães. Estudo sorológico e anátomo-patológico. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 16:154-159, 1974.
16. Muchmore, H.G.; Mc Kossin, B.A. & Mohr, J.A. - Effect of steroid hormones on the growth of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: - Pan American Symposium on paracoccidioidomycosis. 1, Medellin, 1971. Proceedings. PAHO. (Scient. Publ. n° 254) p. 300-304, 1972.
17. San Blas, F. & San Blas, G. - Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Del Negro, G.; Lacaz, C.S. & Fiorillo, A.M., eds. - Paracoccidioidomicose: blastomicose sul-americana. São Paulo, Sarvier/EDUSP, p. 35-58, 1982.
18. San Blas, G.; San Blas, F. & Serrano, L.E. - Host-parasite relationships in the yeastlike form of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb9. *Infect. Immun.*, 15:343-346, 1977.
19. Scrofernecker, M.L. - Contribuição para o estudo da composição antigenica do *Paracoccidioides brasiliensis*: comparação entre 5 amostras. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1982. (Tese de Doutorado).

RELATO DE UM CASO DE DERMATOFITOSE PELO TRICHOPHYTON TONSURANS NO RIO GRANDE DO SUL

Adelina Mezzari
 Paulo Fausto Cauduro
 & Cicero A.G. Dias

Laboratório Weinmann
 Rua Ramiro Barcelos, 910/59 andar
 90210 Porto Alegre RS, Brasil

Resumo

É relatado mais um caso de dermatofitose por *Trichophyton tonsurans* ocorrido no Rio Grande do Sul, e comentado seu provável significado.

Summary

Trichophyton tonsurans: description of a case seen in the State of Rio Grande do Sul, Brazil

Another case of *Trichophyton tonsurans* infection in Rio Grande do Sul is described. The importance of this finding is commented.

Introdução

As referências no Rio Grande do Sul sobre o *Trichophyton tonsurans*, no que tange à ocorrência de infecções, são raras. O primeiro relato é devido a Assis (1) que em 1929 publicou um caso autóctone de dermatofitose por *T. tonsurans* em nosso Estado. A presença deste fungo não foi assinalada em inquérito realizado no período de 1960-1979, no interior do estado (5).

No entanto, em 1981, foram relatados três casos de infecção por *T. tonsurans* em crianças procedentes da Paraíba e Ceará (6). Recentemente, foi comunicada uma epidemia envolvendo 11 casos, ocorrida em um abrigo de menores, na capital do Estado (2). A origem da infecção, nesta epidemia, não foi assinalada.

T. tonsurans é um dermatófito que ocorre nos estados brasileiros situados na faixa intertropical (4). É a espécie dominante nos estados das regiões Norte e Nordeste e sua prevalência é tanto maior quanto mais setentrional for a região (6).

Em nosso serviço obtivemos, no decorrer do outono de 1986 um caso de dermatofitose por *Trichophyton tonsurans*, em criança, residente na grande Porto Alegre. Este achado de um novo caso faz pensar na possibilidade da implantação desta dermatofitose em nosso Estado, justificando sua publicação.

Caso clínico - Paciente: L.M.S.; Sexo: Feminino; Idade: 2 anos; Período de evolução da infecção: 4 meses.

Aspecto e localização da lesão: uma área circular de tonsura no couro cabeludo, medindo 9,5cm de diâmetro, cuja superfície apresentava-se coberta de escamas acinzentadas.

Material e Métodos

Exames micológicos - Os pelos foram epilados e as escamas obtidas pelo raspado da Rev. Microbiol., São Paulo, 18(4):357-359, Out./Dez. 1987.

lesão. O material foi montado em solução de hidróxido de sódio a 10% e examinado ao microscópio. O cultivo foi realizado em ágar Sabouraud adicionado de cicloheximida e cloranfenicol, e incubado a 25°C.

Resultados e Discussão

Ao exame direto, os pelos apresentavam-se repletos de cadeias de arthroconídios, medindo 5 a 8mm, lembrando o aspecto de "saco de nozes"; as crostas continham hifas hialinas, septadas e ramificadas, em grande parte fragmentadas em arthroconídios. A partir do material semeado observou-se o crescimento de colônias brancas, de aspecto aveludado no centro e pulveroso na periferia.

O verso das colônias mostravam pigmento cor de ferrugem (Figura 1). Micromorfologicamente, as colônias eram compostas de hifas hialinas, septadas e ramificadas.

Inúmeros microconídios nasciam de hifas intumescidas.

Os microconídios mostravam forma e tamanhos variáveis.

Clamidoconídios também foram observados (Figura 2).

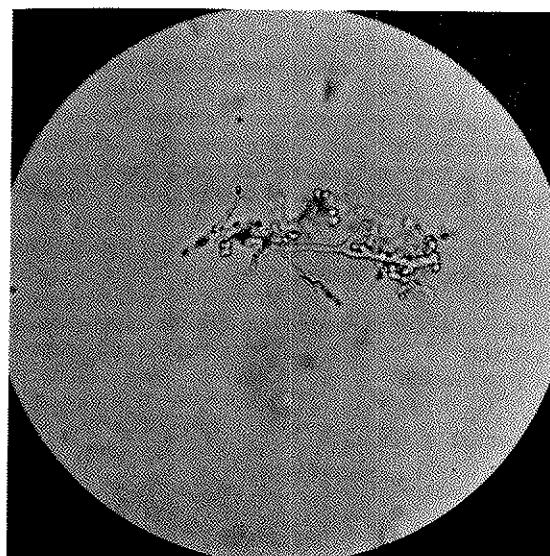
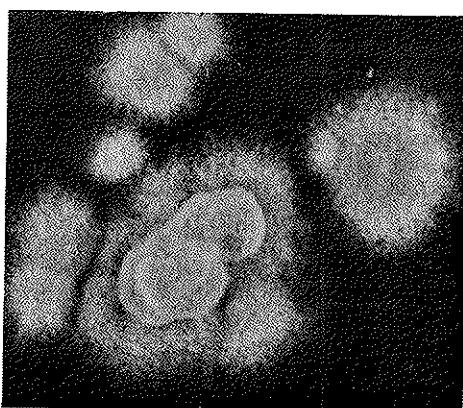
Os caracteres macro e micromorfológicos permitiram identificar a colônia como de *T. tonsurans*, segundo os critérios de Georg (3).

T. tonsurans foi introduzido nos Estados Unidos por imigrantes mexicanos e, uma vez instalado tornou-se a espécie dominante, substituindo *Microsporum audouini* (7). É possível que, fato semelhante esteja ocorrendo nos estados do sul do Brasil, onde aquele fungo tem sido introduzido por imigrantes dos estados do norte e do nordeste (6).

Dos casos Sul Rio-Grandenses, o descrito por Assis (1) é tido como autóctone. Os três casos relatados por Ramos & col. (6), são considerados de importação. Lamentavelmente não foi investigada a origem do caso determinante da microepidemia verificada por Bassanesi (2) e, não foi possível detectar a origem do presente caso. Porem, a ocorrência desta microepidemia e a do caso isolado, ora relatado, deixam claro a possibilidade da existência de maior número de infecções por este dermatófito em nosso Estado. Esta possibilidade serve de alerta a clínicos e micologistas para o aparecimento de um importante problema de saúde pública.

Figura 1 - Colônia de *T. tonsurans* com 7 dias de crescimento em Ágar de Sabouraud adicionado de Cicloheximida e Cloranfenicol

Figura 2 - Microconídios de *T. tonsurans* em KOH 10%



Agradecimentos

Aos Drs. Alberto T. Londero e Cecy D. Ramos, do Deptº de Micologia da Universidade Federal de Santa Maria, pela colaboração.

Referências Bibliográficas

1. Assis, J.C. - Um caso de tinea pelo *Trichophyton flavum*. Arq. Rio-Grandense Med., 2:2-4, 1929.
2. Bassanesi, M.C.; Annes, E. & Severo, L.G. - Microepidemia por *Trichophyton tonsurans* em internato de meninos. Rev. Amrigs, (Porto Alegre), 30:100-102, 1986.
3. Georg, L.K. - Studies on *Trichophyton tonsurans*: morphology and Laboratory identification. Mycologia, 48:354-370, 1952.
4. Londero, A.T. - The geographic distribution and prevalence of dermatophytes in Brasil. Sabourundia, 2:108-110, 1962.
5. Londero, A.T. & Ramos, C.D. - A twenty year (1960-1979) survey of dermatophytes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Caracas, Fifth Pan-American Conferences on Mycosis, 27-30 April, publication nº 396, 1980.
6. Ramos, C.D.; Rojas, S.F. & Londero, A.T. - Dermatofitoses por *Trichophyton tonsurans* observados no Rio Grande do Sul. Rev. Amrigs (Porto Alegre), 25:236-238, 1981.
7. Saferstein, H.L.; Reid, B.J. & Blank, F. - Endothrix ringworm: a new public health problem in Philadelphia. Jama, 190:851-852, 1964.

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA IN VITRO DE ALGUMAS AMIDAS NATURAIS E SEUS PRECURSORES

Astréa M. Giesbrecht

Rita de Cássia S.B. Caldas Barbosa

Deptº de Farmacologia

Instituto de Ciências Biomédicas USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1524

05508 SÃO PAULO SP, Brasil

& Claudete Rodrigues Paula

Deptº de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Investigou-se a atividade antifúngica de benzamidas da O-metiltiramina, isoladas de uma laurácea brasileira, e de alguns de seus precursores e derivados frente a diversas leveduras e fungos filamentosos. Uma das substâncias (2-6-diidroxibenzoato de O-metiltiramina) mostrou-se particularmente ativa, inibindo o crescimento de todas as culturas estudadas com exceção dos fungos do gênero *Aspergillus*.

Summary

Antifungal activity of natural amides

The antifungal activity of N-benzoyltyramines and their precursors, isolated from a Brazilian Lauraceae was investigated. One of the substances, N-2,6-dihydroxybenzyl-O-methyltyramine proved to be active against several of the selected microorganisms.

Introdução

A tendência atual na pesquisa de produtos naturais visa ao isolamento de princípios ativos das plantas para uma possível aplicação prática.

Embora a maioria dos antibióticos antifúngicos tenha sido até agora fornecida por microrganismos, as plantas também podem ser fontes potenciais de substâncias com essa atividade (8).

Sabe-se que muitos fungos são capazes de germinar na superfície de plantas mas, suas raízes em crescimento sobrevivem ao ataque de inúmeros microrganismos que seriam capazes de destruí-las (5). Também os lenhos de plantas superiores resistem ao ataque de fungos, bactérias e animais marinhos. Existe pois nas plantas, um mecanismo protetor que se deve à presença de substâncias antibióticas de natureza específica (4). De fato, muitas substâncias possuindo forte atividade antibiótica foram obtidas de extratos de plantas utilizadas popularmente no tratamento de micoses, como o falcarindiol isolado de *Schefflera digitata* (7) ou o poligodial de *Pseudowintera colorata* (6), para citar apenas alguns exemplos. Assim, a medicina popular que utiliza infusões ou extratos vegetais para o tratamento de infecções, pode ter uma base quimioterápica (8).

Em um programa de triagem de extratos de plantas brasileiras para avaliação de atividade antibiótica, verificou-se que o extrato clorofórmico de frutos e cálices de *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) possui forte atividade in vitro frente a bactérias e leveduras (2).

O estudo fitoquímico desse extrato mostrou que os constituintes mais abundantes são benzâmidas de O-metiltiramina (Figura 1, estruturas I, II, III, e IV) que ocorrem nessa espécie vegetal ao lado de alguns de seus precursores como a O-metiltiramina (VII) e o ácido 2,6-diidroxibenzólico (X) e de outros tipos de produtos naturais (1). Com exceção da amida I que já foi isolada de rutáceas (3), é a primeira vez que essas amidas são isoladas de plantas.

Neste trabalho investigou-se a atividade desses compostos naturais, de seus precursores (VII, VIII, IX e X) e de alguns derivados sintéticos (V e VI) frente a leveduras de interesse médico e frente a alguns fungos filamentosos, dermatófitos e produtores de aflatoxinas, sendo que a atividade frente a bactérias já foi relatada (Barbosa Filho e col. Phytochemistry, no prelo).

Material e Métodos

Os fungos estudados foram: *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus* sp, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum*, sendo as culturas procedentes da Micoteca do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As estruturas das substâncias estão representadas na Figura 1. Para avaliação da atividade antifúngica frente às leveduras, empregou-se a técnica de difusão em ágar. Para tanto, 18ml de ágar Sabouraud-dextrose foram inoculados com uma suspensão de levedura em solução fisiológica (escala 3-Mac Farland) e amostras de 30 μ l das soluções das substâncias em DMSO/H₂O 50% (0,5mg/ml) foram introduzidas em cavidades nas placas de ágar. Também foram ensaiadas amostras do solvente e do antifúngico Ketoconazol, como controle. As placas foram incubadas a 35°C e as leituras realizadas após 48 horas.

Para avaliação da atividade frente a fungos filamentosos foi utilizado o método de diluição em série em meio líquido (Sabouraud-dextrose), em concentrações que variaram de 500 μ g/ml a 62,5 μ g/ml. Os fungos foram incubados à temperatura de 25°C e as leituras realizadas após intervalos de 5, 10, 15 e 20 dias.

Resultados e Discussão

Nos ensaios com leveduras foi avaliada a atividade das 4 amidas naturais, dos seus precursores ácidos benzólico, salicílico, diidroxibenzólico e O-metiltiramina e dos seus derivados V e VI.

Os diâmetros (mm) dos halos de inibição, para a concentração de 500 μ g/ml, foram os seguintes: Amida III: *C. albicans* (16), *C. tropicalis* (10), *C. neoformans* (14), *R. rubra* (15) e *T. glabrata* (9); ácido benzólico: *R. rubra* (15); ácido salicílico: *R. rubra* (17); ácido 2,6-diidroxibenzólico: *R. Rubra* (14) e Ketoconazole (antifúngico padrão): *C. neoformans* (35) e *R. rubra* (23).

Verificou-se então que a substância III inibiu o crescimento de todas as leveduras ensaiadas e que as demais substâncias foram completamente inativas com exceção dos três ácidos que inibiram *R. rubra*. É interessante observar que as amostras estudadas de *C. albicans* e *T. glabrata* são resistentes ao antifúngico de referência.

Pelo método da diluição em série com os fungos filamentosos, só foram ensaiadas as quatro amidas naturais. As concentrações inibitórias mínimas desses compostos, frente aos dermatófitos estão apresentadas na Tabela 1. Embora apenas a amida III tenha se mostrado ativa contra as leveduras, todas elas inibiram o crescimento de pelo menos um dermatófito. Nenhuma delas entretanto inibiu o crescimento de qualquer dos fungos do gênero *Aspergillus*, até a concentração de 500 μ g/ml.

Figura 1 - Estruturas químicas das substâncias ensaiadas

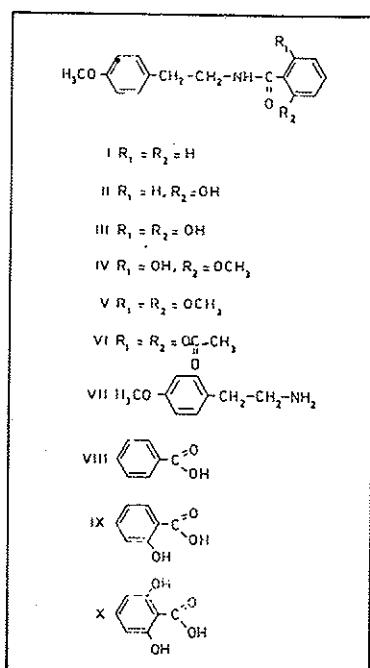


Tabela 1 - Concentrações inibitórias mínimas de amidas naturais ($\mu\text{g}/\text{ml}$) frente a dermatófitos.

Símbolos: NI = Nenhuma inibição até $500\mu\text{g}/\text{ml}$

Substâncias	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>	<i>T. rubrum</i>
I	NI	250	500
II	125	125	125
III	250	250	250
IV	NI	NI	125
meio + fungo	NI	NI	NI
meio + fungo + solvente	NI	NI	NI

Agradecimentos

Os autores desejam expressar o seu agradecimento: ao CNPq pela bolsa concedida à Sra. R.C.B.C. Barbosa; ao Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo na pessoa do Dr. José Maria Barbosa Filho que cedeu as substâncias ensaiadas; à Sra. Cynira S. Passos pelo seu auxílio técnico.

Referências Bibliográficas

1. Barbosa Filho, J.M. - Constituintes químicos dos gêneros *Aniba*, *Licaria* e *Nectandra*. São Paulo, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, 1986. (Tese de Doutoramento).
2. Barbosa, R.C.S.B.C.; Giesbrecht, A.M.; Barbosa Filho, J.M.; Yoshida, M. & Gottlieb, O.R. - Atividade antibiótica de extratos de lauráceas. VIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Manaus, AM, Resumos, p.65, 1984.
3. Chatterjee, A.; Chakrabarty, M. & Kundu, A.B. - Constituents of *Pleiospermum alatum*. Aust. J. Chem., 28:457-460, 1975.
4. Harbone, J.B. - Introduction to ecological biochemistry. London, Academic Press, 1977.
5. Lucas, E.H. & Lewis, R.W. - Antibacterial substances in organs of higher plants. Science, 100:597-599, 1944.
6. McCallion, R.F.; Cole, A.L.J.; Walker, J.R.L.; Blunt, J.W. & Munro, M.H.G. - Antibiotic substances from New Zealand plants: polygodial, an anti-candida agent from *Pseudowintera colorata*. Planta Med., 44:134-138, 1982.
7. Muir, A.D.; Cole, A.L.J. & Walker, J.R.L. - Antibiotic Compounds from New Zealand plants. I - Falcarindiol, an anti-dermatophyte agent from *Schefflera digitata*. Planta Med., 44:139-133, 1982.
8. Ryley, J.F.; Wilson, R.G.; Gravestock, M.B. & Poyser, J.P. - Antifungal chemotherapy. Adv. Pharmacol. Chemoth., 18:49-176, 1981.

AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA EM LODO DIGERIDO SUBMETIDO A TRATAMENTO QUÍMICO E TÉRMICO

Walderez Gambale
 Claudete Rodrigues Paula
 Benedito Correa
 Adhemar Purchio
 & Maria Therezinha Martins

Deptº de Microbiologia - Seção de Micologia
 Instituto de Ciências biomédicas da USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Amostras de lodo digerido bruto e centrifugado apresentaram alta incidência de bolores (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Verticillium*, *Trichoderma* e outros gêneros) e leveduras (*Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* e *Geotrichum*). Após tratamento térmico (50°C a 115°C durante 5 a 15 minutos) não houve redução do número de gêneros e colônias de fungos. Após tratamento químico (cloreto férreo e cal) houve redução de 50% no número de gêneros de bolores e 70% no número de colônias de levedura. Concluiu-se que lodos de esgoto provenientes de digestores apresentam alta contaminação por fungos e os tratamentos utilizados não reduzem seu teor em níveis significativos.

Summary

Valuation of molds and yeasts in raw sludge after thermic and chemical treatment

Samples of digested and centrifugated raw sludge presented high incidence of molds (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Scedosporium*, *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Verticillium*, *Trichoderma* and others genera) and yeasts (*Candida*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Torulopsis* and *Geotrichum*): Following thermic treatment (50°C to 115°C during 5 to 15 minutes) no reduction in the number of the fungi genera and in the colony forming units was observed. Chemical treatment by ferric chloride and lime removed 50% of the mold genera and 70% of the number of yeast colonies. The results indicate that digested sludge presented high fungi contamination which failed to be reduced significantly by the proposed methods.

Introdução

A etapa de disposição final de lodos de esgotos consome de 30 a 40% dos custos de uma estação de tratamento (9). Afim de se minimizar esse alto custo, soluções tem sido preconizadas como por exemplo a sua utilização para fins agrícolas. Nesse sentido, uma das limitações é a presença de patógenos relatada frequentemente em lodos digeridos (3, 6, 8).

Em nosso meio, Martins & col. (7) verificaram em lodos digeridos submetidos a tratamento químico, uma redução de coliformes fecais (99,9%), estreptococos fecais

(99,6%), salmonelas (98,7%), enterovirus (75%) e de ovos de helmintos (99,6%). Assinalaram ainda a menor eficiência do tratamento térmico na eliminação de bactérias e ovos de helmintos, porém alta eficiência na eliminação de enterovirus (100%).

Devido à ausência de estudos relativos a fungos em lodos de esgotos, o objetivo é a caracterização desses microrganismos em lodos digeridos de uma Estação de Tratamento de Esgotos de São Paulo, assim como de lodos submetidos a tratamento térmico e químico.

Material e Métodos

Foram colhidas, de março a novembro de 1981, 62 amostras de lodo de esgoto da Estação de Tratamento de Esgotos de Vila Leopoldina, São Paulo, distribuídas da seguinte maneira: a) 11 amostras de lodo digerido obtidas na saída do biodigestor; b) 11 amostras de lodo centrifugado obtidas na saída da esteira; c) 11 amostras de lodo prensado (lodo digerido submetido a tratamento químico com cloreto férrico e cal); d) 17 amostras de lodo fluidizado (lodo digerido submetido a tratamento térmico - 50°C a 115°C durante 5 a 15 minutos) obtidas diretamente no páteto de secagem; e) 12 amostras de lodo fluidizado obtidas após 30 dias no páteto de secagem.

Eram semeados 1ml de uma diluição 1/100 em placas de Petri com ágar Sabouraud adicionado de 100µg/ml de cloranfenicol. A seguir as placas eram incubadas em estufa a 25°C durante 5 dias e as colonias eram contadas e identificadas genericamente através dos métodos usuais de identificação micológica (1, 2).

Resultados e Discussão

Os resultados estão expressos na Tabela 1, onde observa-se a alta ocorrência tanto de bolores como de leveduras. A maioria desses fungos tem seu habitat no solo e, pelo seu modo de dispersão, são encontrados nos mais variados ambientes. Dos 28 gêneros detectados, em torno de 60% tem como uma das vias de dispersão, o ar atmosférico, sendo encontrados em alta frequência na região da Grande São Paulo (5) e relacionados com alergias das vias respiratórias no homem*. Apesar de não terem sido identificados até espécie, esses gêneros

Tabela 1 - Número de colônias de fungos isolados em lodos de esgoto obtidos na Estação de Tratamento de Esgotos de Vila Leopoldina, São Paulo.

Símbolos: LD = Lodo digerido; LC = Lodo centrifugado; LP = Lodo prensado LFAC = Lodo fluidizado, amostras comuns; LF-30d = Lodo fluidizado após 30 dias; () = Nº de amostras analizadas; - = Isolamento negativo

Gêneros de fungos	LD (11)	LC (11)	LP (11)	LFAC (17)	LF-30d (12)
Bolores					
<i>Aspergillus</i>	177	25	11	398	163
<i>Cladosporium</i>	7	-	1	10	2
<i>Monotispora</i>	1	11	-	-	-
<i>Phoma</i>	6	3	-	-	-
<i>Fusarium</i>	22	5	-	1	-
<i>Scedosporium</i>	18	29	20	20	2
<i>Penicillium</i>	9	29	3	44	15
<i>Cephalosporium</i>	8	6	-	-	1
<i>Dendrostilbella</i>	10	-	-	-	-
<i>Verticillium</i>	13	4	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	24	22	-	2	2
<i>Mucor</i>	2	3	-	83	21
<i>Peyronellaea</i>	2	-	-	-	-
<i>Paeciliomyces</i>	-	3	6	1	5
<i>Eurotium</i>	-	3	-	-	-
<i>Monascus</i>	-	7	-	2	-
<i>Scopulariopsis</i>	-	1	145	3	-
<i>Helicodendron</i>	-	-	2	-	-
<i>Syncephalastrum</i>	-	-	-	7	1
<i>Rhizopus</i>	-	-	-	1	1
<i>Alternaria</i>	-	-	-	-	1
<i>Não esporulados</i>	3	10	10	13	2
Total	302	161	198	585	216
Média	27,4	14,6	18,0	34,4	18,0
Leveduras					
<i>Candida</i>	75	87	5	5	-
<i>Trichosporon</i>	2	25	20	122	71
<i>Rhodotorula</i>	20	25	-	26	31
<i>Torulopsis</i>	1	3	-	4	-
<i>Geotrichum</i>	4	10	2	-	5
<i>Cryptococcus</i>	-	-	1	-	-
Total	102	150	28	157	107
Média	9,3	13,6	2,5	9,2	8,9

* Gambale, W.; Mohovic, J.; Paula, C.R.; Côrrea, B. & Purchio, A. - Testes intradérmicos com 42 extratos alergênicos de fungos anemófilos isolados em São Paulo, Brasil - Apresentado no XIV Congresso Brasileiro de Microbiologia Viçosa, 1987.

abrangem representantes potencialmente patógenos para uma grande variedade de plantas (4).

No lodo submetido a tratamento químico, houve uma redução de 50% no número de gêneros de bolores, fato não observado no lodo após tratamento térmico, possivelmente pela ocorrência de recontaminação.

Com relação às leveduras não houve alteração significativa no número de gêneros, mas houve redução de 70% no número de colônias após tratamento químico.

Pelo exposto conclui-se que lodos de esgoto provenientes de digestores apresentam alta contaminação por fungos e os tratamentos utilizados não reduzem o seu teor em níveis significativos.

Agradecimentos

À CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental), IPT (Instituto de Pesquisas Tecnológicas) e SABESP (Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo) pelo apoio e permissão para divulgação destes resultados.

Referências Bibliográficas

1. Arx, J.A., von - Fungi sporulating in pure culture. 2.ed. Germany, J. Cramer, 1974.
2. Barron, G.L. - The genera of Hyphomycetes from soil. New York, R.E. Krieger, 1971.
3. Burge, W.D. & Marsh, P.B. - Infectious disease hazards of landspreading sewage wastes. *J. Environ. Qual.*, 7:1-9, 1978.
4. Galli, F.; Tokeshi, H.; Carvalho, P.C.T.; Balmer, E.; Kimati, H.; Cardoso, C.O.N. & Salgado, C.L. - Manual de fitopatologia: doenças das plantas e seu controle, Piracicaba, Ed. Agron. Ceres, 1968.
5. Gambale, W.; Purchio, A. & Croce, J. - Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo. *Rev. Microb.*, (São Paulo), 8:74-79, 1977.
6. Hays, B.D. - Potential for parasitic disease transmission with land application of sewage plant effluents and sludges. *Water Res.*, 11:583-595, 1977.
7. Martins, M.T.; Sanchez, P.S. & Marques, E. - Eficácia do tratamento químico e térmico na destruição de patógenos em lodo digerido. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 17:148-154, 1986.
8. Menzies, J.D. - Pathogen considerations for land application of human and domestic animal wastes. In: - Soils for management of organic wastes and wastewater. Beltsville, Maryland American Society of Agronomy, p.575-585, 1977.
9. Vesilind, P.A. - Treatment and disposal of wastewater sludges. *Ann. Arbor Science Publ.*, 1974.

SCOPULARIOPSIS BREVICAULIS: AGENTE ETIOLÓGICO DE DERMATOSE EM CÃES E EQUINOS

Claudete Rodrigues Paula

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

Elizabeth Oliveira da Costa

Deptº Med. Vet. Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Med. Veterinária e Zootecnia USP
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP, Brasil

Maria de Fátima Costa Pires

Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP

Selene Dall'Acqua Coutinho
Vânia M. Carvalho
Wisner Castilho
& Maria S. Moral

Deptº de Medicina Vet. Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Med. Veterinária e Zootecnia USP

Resumo

Scopulariopsis brevicaulis é considerado fungo oportunista e tem sido associado a processos patológicos, tanto no homem como nos animais. O presente trabalho relata, pela primeira vez em nosso meio, o isolamento desse microrganismo em equinos (cinco) e em cães (três) com dermatose crônica. A maioria das amostras isoladas apresentou dimorfismo térmico, fase filamentosa à 25°C e fase leveduriforme à 37°C, fenômeno observado em alguns fungos patogênicos. Convém ressaltar que ao exame direto do material observou-se tanto estruturas características da fase filamentosa como estruturas leveduriformes.

Summary

Scopulariopsis brevicaulis: etiologic agent of dermatosis in dogs and horses

Scopulariopsis brevicaulis is considered an opportunistic fungus, which causes many clinic manifestations in man and in other animals. This paper relates the isolation of *S. brevicaulis* from horses (five) and dogs (three) with chronic dermatosis. The culture presented dimorphism, mould phase at 25°C and yeast-like phase at 37°C, phenomenon related to the several pathogenic fungi. Under microscopic examination, the clinical material revealed structures of the mould phase and the yeast-like phase.

Introdução

Scopulariopsis brevicaulis é considerado um fungo oportunista, frequentemente isolado de diversos materiais biológicos e responsável por quadros clínicos variados, tanto no homem como em animais (10, 2). Lesões cutâneas semelhantes às dermatofitoses já foram referidas nas espécies bovina e suína, sendo este fungo, citado também, como responsável por aborto em bovinos e como agente causal de diversas manifestações patológicas em camundongos, após inoculação peritoneal (1, 8, 9, 10, 16).

Em estudos anteriores verificou-se que *S. brevicaulis* apresenta dimorfismo térmico (M>Y), fenômeno observado na maioria dos fungos produtores de micoses sistêmicas e que está relacionado com a patogenicidade (4, 7).

O presente trabalho relata, pela primeira vez em nosso meio, o isolamento de *S. brevicaulis* de equinos e de cães com dermatose crônica.

Material e Métodos

Animais - Foram estudados três cães e quatro equinos com lesões crônicas crostosas e com alopecia. Esses animais apresentavam grande diversificação quanto à localização e extensão do processo. Nos equinos (dois) observaram-se lesões circunscritas a uma determinada área (extremidade distal dos membros anteriores, primeira falange); nos outros dois animais houve disseminação do processo com lesões generalizadas. Nos cães (dois) ocorreram lesões múltiplas na região central (torácica e abdominal) e faces interna e externa dos pavilhões auriculares, enquanto no terceiro cão, as lesões localizavam-se na região dorsal, cauda e membros.

Procedimentos micológicos - As crostas e pelos obtidos dos animais com lesões foram clarificados com potassa a 30% e observados diretamente ao microscópio.

O cultivo foi efetuado em ágar Sabouraud-dextrose (Difco) acrescido de cloranfenicol (100 μ g/ml) e em ágar "Mycobiotic" (Difco), com incubação à 25°C, e observação até 40 dias. As culturas foram identificadas através de técnicas micológicas usuais: características macroscópicas e microscópicas estudadas através de colônia gigante, em ágar Sabouraud-dextrose, e através de microcultivo, em ágar batata (Técnica de Ridell, 17). A chave de classificação empregada foi a de Morton & Smith (15).

As colônias isoladas foram também cultivadas em ágar Malte (Oxoid), acrescido de extrato de malte, incubadas à 37°C, em atmosfera de 5 - 10% de CO₂, para a obtenção da fase leveduriforme (7).

Resultados

Achados micológicos - O exame direto do material revelou em alguns casos estruturas globosas, ovais ou piriformes, com brotamento, catenuladas, com parede espessa e refringente, com ou sem filamentos. Em outros casos foram observadas hifas septadas, ramificadas, conidióforos curtos, com conídios lisos ou verrucosos, isolados ou em cadeia (Figura 1).

S. brevicaulis foi isolado em cultura pura após 10-20 dias de incubação, apresentando inicialmente colônias claras, membranosas e glabrosas. Após 20 dias as colônias tornavam-se marrons, granulosas e pulverulentas (Figura 2). Ao exame microscópico observaram-se hifas septadas, ramificadas, anelóforos, aneloconídios globosos ou ovais (5 x 9 μ), com a base truncada, lisos ou verrucosos (Figura 3).

Três culturas obtidas de cães e uma de equino apresentaram dimorfismo térmico, após 3 repiques adaptativos, crescendo em consistência cremosa ou mucosa (Figura 2).

O exame microscópico revelou células hialinas arredondadas ou ovaladas, com uma ou mais gêmulas, em base larga ou estreita, medindo de 4 a 12 μ de comprimento por 4 a 7 μ de diâmetro (Figura 4).

Figura 1 - Raspado de pele e pelos de equino onde observa-se hifas ramificadas e septadas observa-se hifas ramificadas e septadas, conidióforos curtos, fiálides em arranjo de penicillus e conídios. (100x e 400x)

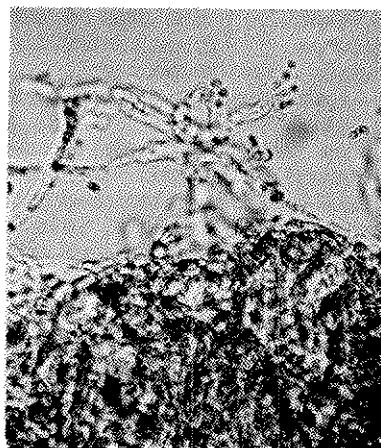
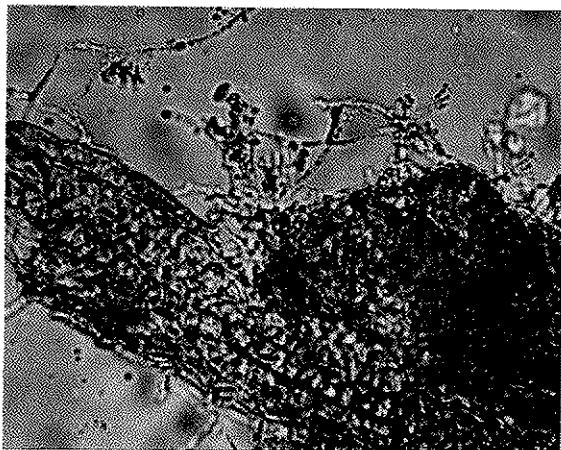


Figura 2 - Colônias de *S. brevicaulis* na fase miceliana e leveduriforme (M e Y)

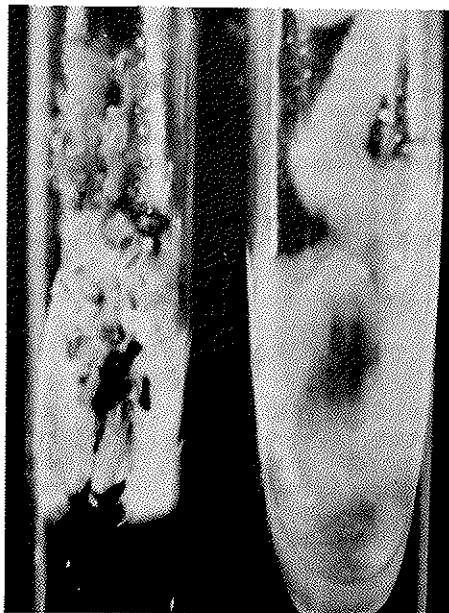
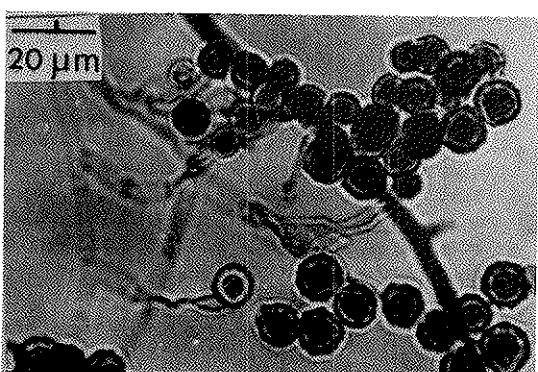


Figura 3 - Aspecto microscópico da colônia de *S. . brevicaulis* na fase miceliana (M)



Discussão e Conclusões

S. brevicaulis é um fungo cosmopolita frequentemente isolado do solo de regiões tropicais, com propriedades proteolíticas e que vem emergindo no campo da micologia

médica como agente etiológico de várias lesões (2).

Desde 1910 este fungo é citado como agente de onicomicose, sendo atualmente, considerado o mais frequente agente oportunista deste tipo de manifestação clínica (3, 20).

Casos de dermatite vesiculopustulosa de nuca e tronco; de dermatose do tronco e braço; de tricofícia profunda da barba; de infecções subcutâneas; de granulomas ulcerativos da pele; de formação de "bola fúngica"; de otomicose, assim como de endoftalmite têm sido a ele associados (2, 5, 11, 12, 19).

A literatura é mais escassa em relação à patogenicidade para outros animais, sendo poucos os trabalhos de real importância, como o de Kintner & Blenden (10), que descreve este fungo como agente causal de lesões superficiais em novilhos, e o de Purchio & col. (16) que relata *S. brevicaulis* como agente da pitiriase rósea de suínos.

Os casos estudados no presente trabalho permitiram destacar alguns pontos de importância:

- Observação do fungo com estruturas típicas ao exame direto do material.
- Isolamento do fungo em cultura pura nos vários tubos semeados com os materiais clínicos, tanto no ágar Sabouraud-dextrose como no ágar "Mycobiotic".
- Não isolamento de dermatófitos ou outro fungo patógeno, mesmo após 40 dias de observação.

Aqui convém salientar que estruturas globosas, ovais e piriformes observadas ao exame direto, foram descritas por outros autores em materiais clínicos e correspondem à sua fase leveduriforme (13, 16, 20).

Das sete culturas isoladas, quatro apresentaram dimorfismo térmico ($M \rightarrow Y$), fenômeno descrito anteriormente em *S. brevicaulis* e relacionado à patogenicidade (7). A não conversão de todas as amostras já foi verificada em culturas de outros fungos considerados dimórficos e patogênicos, tal como *P. brasiliensis* (18). Segundo McGinnis (14) não é necessária a total conversão de um cultivo para se caracterizar o dimorfismo, pois o grau de conversão depende da amostra em estudo, salientando-se que *S. brevicaulis* é de difícil transformação (7).

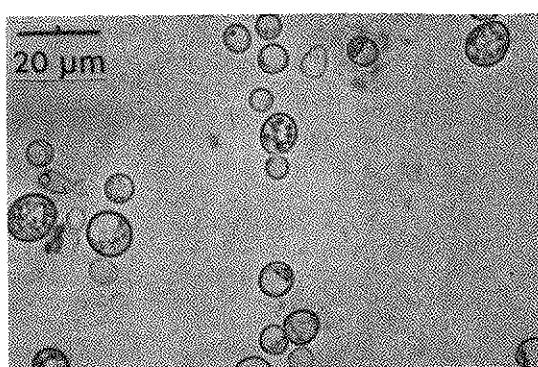
Outro ponto a ser destacado é que este fungo provocou lesões semelhantes às dermatofitoses e, de modo geral, o mesmo é descrito na literatura como resistente à griseofulvina, fármaco de eleição para este tipo de micose, tanto no homem como em animais (6, 21).

As que tudo indica, levando-se em consideração que os achados foram criteriosamente estudados, *S. brevicaulis* é descrito pela primeira vez, em nosso meio, como agente primário de dermatoses em cães e equinos.

Referências Bibliográficas

1. Ainsworth, G.C. & Austwick, P.K.C. - Fungal diseases of animals. 2.ed. Slough, Commonwealth Agricultural Bureaux, 1973.
2. Al-Doory, Y. - Laboratory medical mycology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1980.
3. Brumpt, E. & Langeron, M. - In: - Brumpt's Précis de parasitologie. Paris, p.834-840, 1910.
4. Cochrane, V.M. - Physiology of fungi. New York, John Wiley, 1958.
5. Emmons, C.; Binford, C.H. & Utz, Y.P. - Medical mycology. 2.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1970.

Figura 4 - Aspecto microscópico da colônia de *S. brevicaulis* na fase leveduriforme (Y)



6. Fragner, P. & Belsan, I. - *Scopulariopsis bainier* as causative agent of onychomycoses. *Acta Univ. Carol. Med.*, 20:305-332, 1974.
7. Gandra, C.R.P. - Contribuição ao estudo morfológico de *Scopulariopsis brevicaulis* Bainier, 1907. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 1983. (Tese de Doutorado).
8. González-Ochoa, A. & Castillo, E.D. - Frecuencia de *Scopulariopsis brevicaulis* en muestras de suelo en cuevas y minas del país. *Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop.*, 20:247-252, 1960.
9. Hillman, R.B. - Bovine mycotic placentitis in New York, State. *Cornell Vet.*, 59:269-288, 1969.
10. Kintner, L.D. & Blenden, D.C. - Mycotic dermatitis in a steer. *Jama*, 138:9-12, 1961.
11. Larsh, H.W. - Opportunistic fungi in chronic disease other than cancer and related problems. In: - International Society for Human and animal mycology. Recent advances in medical and veterinary mycology: Proceedings of the 6º Congress of the Isham, Tokyo, 1975. Baltimore, University Park Press, p.221-229, 1977.
12. Londero, A.T. & Cercal, E. - Onicomicose por *Scopulariopsis brevicaulis* Bainier, 1907. Santa Maria, R.S. (Publicação nº 5 Soc. Farm. Quim.), 1956.
13. Martin-Scott, I. - Onychomycosis caused by *Scopulariopsis brevicaulis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 37:34-38, 1954.
14. McGinnis, M. - Laboratory handbook of medical mycology. New York, Academic Press, 1980.
15. Morton, F.J. & Smith, G. - The genera *Scopulariopsis* Bainier, *Microascus* Zukal and *Doratomyces* Corda. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1963. (Mycological Papers nº 86).
16. Purdho, A.; Machado, A.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Mariano, M. - *Scopulariopsis brevicaulis*: a possible etiologic agent of pityriasis rosea in piglets. In: International Conference of the mycoses, 5, Washington, 1980. Opas, p.104-111, (Scientific publications nº 396), 1980.
17. Ridell, R.W. - Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. *Mycologia*, 42:265, 1950.
18. San-Blas, F. & San-Blas, G. - Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: - Del Negro, G.; Lacaz, C.S. & Fiorillo, A.M., eds. - Parasoccidioidomicose. São Paulo, Sarvier, Edusp, p.35-58, 1982.
19. Sekhon, A.S. & Williams, D.J. - Deep scopulariopsis: a case and sensitivity studies. *Abs. Annu. Meet. Soc. Microbiol.*, 74:18, 1974.
20. Zaror, L.; Frick, P. & Moreno, M.I. - Micosis ungueal por *Scopulariopsis brevicaulis*. *Rev. Arg. Microbiol.*, 5:12-15, 1982.
21. Welfringer, A. & Percebois, G. - Données sur l'onyxis à *Scopulariopsis brevicaulis*. *Ann. Med. Nancy*, 15:213-218, 1976.

ANTICORPOS ANTI-ROTAVÍRUS EM BOVINOS

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

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

& Luiz Conrado Ribeiro

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

Resumo

Através da reação de imunoelctrosmoforese, utilizando-se como antígeno a amostra Compton-England de rotavírus bovino, pesquisou-se a presença de anticorpos anti-rotavírus em bezerros de 4 a 8 meses de idades, pertencentes a diversas propriedades de criação de gado bovino, localizadas em 30 Municípios do Estado de São Paulo. De 353 amostras de soros analisadas, 172 (48%) foram positivas. Tais resultados sugerem a participação dos rotavírus na etiologia das diarréias de bezerros, nas áreas estudadas.

Summary

Antibodies against rotavirus in calves

By immunolectroosmosphoresis, using Compton-England strain as an antigen, antibodies against rotavirus were studied in calves varying from four to eight months old, in some herds of 30 countries in São Paulo State, Brazil. From 353 serum samples, 172 (48%) were positive. In the areas studied rotavirus infectious may be approached as a cause for neonatal calf diarrhea.

Introdução

As enterites dos bezerros não constituem entidades mórbidas de etiologia precisa. Trata-se de um quadro patológico, no qual podem estar envolvidos bactérias, vírus e protozoários, isoladamente ou em infecções mistas (5).

Atualmente, tem-se verificado aumento na ocorrência de quadros clínicos de diarréia aguda de bezerros, ocasionados por rotavírus, coronavírus, calicivírus, astrovírus, BVD/MD (Bovine Virus Diarrhea/Mucosal Disease) e, o assim chamado, agente "BREDA". Entretanto são os rotavírus e os coronavírus que ocupam lugar de destaque, estando envolvidos em cerca de 60% dos casos de diarréia aguda dos bezerros novos (1).

Do ponto de vista de diagnóstico laboratorial, a imunoelctrosmoforese mostrou ser um método rápido, econômico e bastante sensível na identificação de rotavírus em casos de gastroenterite infantil (2). Aplicando a referida técnica, procuramos

detectar a presença de anticorpos anti-rotavírus em soro de bovinos.

Material e Métodos

Soros - 353 amostras de soro de bezerros entre 4 a 8 meses de idade, de diversas raças, colhidas em diversas propriedades de criação de gado bovino leiteiro, localizadas em 30 Municípios do Estado de São Paulo.

Soro padrão - Soro hiperimune preparado em coelho, a partir da amostra Compton-England de rotavírus bovino, cultivada em células de linhagem MA104 e purificada por plaqueamento.

Antígeno - Amostra Compton-England de rotavírus bovino, cultivada em cultura de células da linhagem MA104.

Cultura de células - Células da linhagem MA₁₀₄ (rim fetal de macaco Rhesus), mantidas em condições de crescimento através de sucessivos repiques em nosso laboratório.

Preparo do antígeno - A amostra Compton-England foi cultivada em monocamada de células da linhagem MA₁₀₄, em garrafas tipo Roux. De cada garrafa com monocamada confluente, o meio de crescimento era desprezado, as células lavadas duas vezes com solução salina esterilizada e adicionadas 5ml da suspensão viral. Após 60 minutos a 37°C adicionava-se 100ml de meio de Eagle, sem soro, com 10mg de tripsina por mililitro de meio e incubava-se a 37°C por aproximadamente 36-48 horas. Procedia-se a raspagem das células da monocamada e tanto células como o fluido extracelular eram submetidos à centrifugação de aproximadamente 100.00g, durante duas horas. O sobrenadante era desprezado e o sedimento resuspensionado em pequeno volume de tampão TRIS 0,1M com pH 7,3. Ao volume total, era adicionado, na mesma proporção volumétrica, Freon T.F. (Triclorotrifluoretano); a mistura era homogeneizada em agitador tipo "mixer" e centrifugada a 3.000rpm durante 10-15 minutos. O sobrenadante era submetido a novo tratamento com Freon T.F., nas mesmas condições, sendo o sobrenadante desta segunda centrifugação utilizado como antígeno na reação de imunoelétroforese.

Reação de imunoelétroforese - Empregou-se os procedimentos descritos por Candeias e col. (2), com algumas modificações: agarose a 1% dissolvida em tampão TRIS com força iônica 0,06 e pH 8,6, para a "corrida" utilizava-se tampão TRIS com força iônica 0,113 e pH 8,6 e corrente de 12mA durante 60 minutos.

Tabela 1 - Distribuição das amostras de soro de bezerros entre 4 e 8 meses de idade, segundo os Municípios onde se encontravam as propriedades de criação visitadas e os resultados da reação de imunoelétroforese para a pesquisa de anticorpos anti-rotavírus bovino, São Paulo, 1985

Municípios	Nº de amostras examinadas	Amostras positivas
Aguai	10	7
Andradina	10	7
Araçatuba	10	6
Avaré	10	3
Batatais	11	5
Bauru	8	0
Bocadouro	9	2
Bragança Paulista	20	10
Campinas	27	15
Colina	12	4
Cotia	10	6
Cravinhos	10	8
Guaratinguetá	10	9
Indaiatuba	10	7
Itapetininga	10	9
Jacareí	10	2
Jau	10	6
Joanópolis	15	0
Lins	11	8
Mirandópolis	10	4
Mococa	12	9
Pinhal	15	7
Registro	10	7
São Carlos	18	6
São José da Bela Vista	10	1
São Pedro	10	7
Sorocaba	14	0
Taquaritinga	12	10
Tatuí	9	4
Votuporanga	10	3
Total	353	172

Figura 1 - Municípios do Estado de São Paulo, nos quais as propriedades de criação de gado bovino visitadas apresentaram animais com anticorpos anti-rotavírus



Resultados e Discussão

Das 353 amostras de soro analisadas, 172 (48%) reagiram com o antígeno rotavírus bovino, amostra Compton-England. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos, estando os soros dos animais classificados segundo os Municípios onde se encontravam as propriedades de criação visitadas. A Figura 1 ilustra os Municípios, nos quais as propriedades de criação visitadas apresentaram animais com anticorpos anti-rotavírus.

A reação de imunoelétrroforese, para a pesquisa de antígeno, em material fecal, é menos sensível de que o ensaio imunoenzimático, a imunomicroscopia eletrônica, a imunofluorescência e a fixação do complemento (3), entretanto, para a pesquisa de anticorpos, trabalhamos com antígeno parcialmente purificado e pudemos observar linha de precipitação perfeitamente nítida.

Desde que se verificou a participação dos rotavírus em quadros clínicos de diarréias em bezerros (6), há nítida evidência de que as infecções por rotavírus devem estar bastante disseminadas (1, 5, 7, 8, 9, 10), acarretando, inclusive, graves perdas econômicas (4). Os resultados encontrados sugerem que esses vírus devem participar da etiologia das diarréias dos bezerros, nas regiões estudadas. Achamos conveniente que maiores estudos acerca da infecção por rotavírus em bovinos sejam realizados, a fim de se avaliar a real magnitude do problema no Estado de São Paulo e em nosso país.

Agradecimentos

Ao Dr. David R. Snodgrass, do Moredun Institute, Edinburgh, Escócia, que nos cedeu o soro padrão; ao Dr. Enrico Lippi Ortolani, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, que manteve contacto com o Dr. Snodgrass, e nos trouxe o soro hiperimune, e a DU PONT do Brasil que nos cedeu, gentilmente, o Freon T.F..

Referências Bibliográficas

1. Bachmann, P.A. - Viral gastroenteritis in calves: causes and prevention. Mod. Vet. Pract., 64:559-565, 1983.

2. Candeias, J.A.N; Rosenburg, C.P. & Rácz, M.L. - Identificação por contrainuncoelectroforese de rotavírus em casos de diarréia infantil. *Rev. Saúde Pública*, 12:99-103, 1978.
3. 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.
4. House, J.A. - Economic impact of rotavirus and other neonatal disease agents of animals. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 173:573-576, 1978.
5. Krogh, H.V. & Henriksen, Sv. - Aa. Bovine cryptosporidiosis in Denmark. 2 - Cryptosporidia associated with neonatal calf diarrhea. *Nord. Vet. Med.*, 37:42-47, 1985.
6. Mebus, C.A.; Underdahl, N.R.; Rhodes, M.B. & Twiehaus, M.J. - Calf diarrhea (scours): reproduced with a virus from a field outbreak. *Neb. Agric. Exp. St. Bull.*, 233:1-16, 1969.
7. Nozawa, C.; Teixeira, A.C. & Vieira, R.M.R. - Anticorpos anti-rotavirus em soro bovinos. In: - Congresso Brasileiro de Microbiologia, IX, Belo Horizonte. 1979: Anais.
8. Turner, A.J.; Caple, I.W.; Craven, J.A. & Reinganum, C. - Demonstration of virus particles in intestinal contents of calves with diarrhoea. *Aust. Vet. J.*, 49:544, 1973.
9. White, R.G.; Mebus, C.A. & Twiehaus, M.J. - Incidence of herds with a neonatal calf diarrhea virus (NCDV). *Vet. Med. Small. Anim. Clin.*, 65:487-490, 1970.
10. Woode, G.N.; Bridger, J.C.; Hall, G. & Dennis, M.J. - The isolation of a reovirus-like agent associated with diarrhoea in colostrum deprived calves in Great Britain. *Res. Vet. Sci.*, 16:102-105, 1974.

CIRCULAÇÃO SIMULTÂNEA DE MYXOVÍRUS E PARAMYXOVÍRUS NUMA COMUNIDADE AVIÁRIA ORNAMENTAL

José Nélson dos Santos Silva Couceiro

Eliane dos Santos Silva Couceiro

& Raimundo Diogo Machado

Deptº de Virologia

Instituto de Microbiologia UFRJ

Centro de Ciências da Saúde Bloco I/Sala 31

21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

O estudo de uma comunidade de aves ornamentais, através de exame periódico de fezes de animais sem sintomas clínicos, levou-nos a observação da circulação de vírus Influenza aviário (H_7N_1) e vírus da doença de Newcastle. Esta observação deu-se em 2 casos estudados, representando 0,5% dos 360 materiais analisados. O exame de fragmentos de pulmão da única ave (*Silicalis brasiliensis*) com sintomas clínicos, deu-nos condição de observação da presença de uma infecção mista por vírus Influenza H_7N_1 e vírus da doença de Newcastle.

Summary

The simultaneous circulation of myxovirus and paramyxovirus in a ornamental bird community

The study of community of ornamental birds, through periodic examination of bird excreta without clinical symptoms, guide us to the observation of simultaneous circulation of avian Influenzavirus (H_7N_1) and Newcastle disease virus. This observation happened in two studied cases, representing 0,5% of the analysed materials. The examination of lung fragments of a single bird (*Silicalis brasiliensis*) with clinical symptoms, evidenced the presence of mixed infection by Influenza virus A H_7N_1 and Newcastle disease virus.

Introdução

Em praticamente todas as regiões do mundo, tem sido descritos isolamentos de vírus Influenza A e vírus da doença de Newcastle, a partir de espécimes oriundos de aves selvagens que, através da migração, possibilitam a expansão da doença às áreas mais diversas do planeta.

Amostras diversas desses vírus têm sido isolados simultaneamente, também de aves ornamentais, domésticas, ou de granjas nos vários continentes do mundo, mostrando uma larga diversidade antigenica, com isolamento relacionado ou não a quadros clínicos (3, 4, 5, 11).

Têm sido observadas com significativa frequência, infecções mistas relacionadas etiologicamente a mais de um tipo de vírus Influenza A aviário e mesmo à mistura de amostras de vírus Influenza A e da doença de Newcastle (NDV) (1, 2, 4, 14). Nosso interesse constitui-se na análise desta incidência entre aves ornamentais brasileiras, num estudo avaliativo, inédito da presença destas infecções, algumas vezes fatais, entre nós.

Material e Métodos

Foram coletadas 360 amostras de fezes frescas de aves exóticas ornamentais, durante 36 meses, em número de 10 amostras por mês, de viveiros de pássaros no bairro de Lins de Vasconcelos, zona norte do Rio de Janeiro. As aves num total de 110, pertenciam a 10 espécies diferentes e eram classificadas em quatro famílias: Faringídeas, Fringílidas, Psitacídeas e Pícidas.

Durante essas três anos, os pássaros permaneceram confinados em viveiros metálicos cobertos, tendo contatos com aves de vida livre, como pardais (*Passer domesticus*), rolinhas (*Columba spix*) e bico-de-lacre (*Estrilda cinerea*), que constantemente, aproximavam-se da área, onde se localizavam os viveiros onde habitavam os pássaros examinados. Os viveiros eram limpos diariamente, com retirada do material fecal e restos alimentares e supridos de alimentação: alpiste, painço, complexo vitamínico (A, B₁, C, óleo mineral e canjiquinha de milho), vegetais, e água potável. As amostras fecais foram agrupadas em séries de 10, coletadas mês a mês, de julho de 1981 a junho de 1984, em séries de A a J'.

Hospedeiros - Utilizaram-se ovos embrionados SPF (Specific Pathogenic Free) de galinhas Leghorn, de 7 dias de incubação (17). Os ovos viáveis eram selecionados com uso de ovoscópio.

Amostras vírais - Foram usadas diferentes amostras padrões de vírus Influenza aviário do National Institute for Medical Research e da Fundação Oswaldo Cruz: A/turkey/Weybridge/79 (H₁N₁), A/duck/Germany/1215/73 (H₂N₃), A/duck/Ukraine/1 63 (H₃N₈), A/duck/Czechoslovakia/56 (H₄N₆), A/tern/S. Africa/61 (H₅N₃), A/Sherwater/E.Aust./72 (H₆N₅), A/FPV/Rostock/34 (H₇N₁), A/turkey/Ontario/6118/68 (H₈N₄), A/turkey/Wisconsin/66 (H₉N₂), A/chicken/Germany/"N"/49 (H₁₀N₇), A/duck/England/56 (H₁₁N₆) e A/duck/Alberta/60/76 (H₁₂N₅).

As amostras padrões de vírus da doença de Newcastle, selvagens (velogênica - amostra SO-93 - EMBRAPA) e vacinais (Lasota e B₁) foram obtidas através do Dr. Ary Moreira de Souza, da EMBRAPA (Empresa Brasileira de Agropecuária, Km 47, Rio de Janeiro).

Soros-padrões - Utilizaram-se soros imunes preparados em cabra contra amostra de vírus Influenza, obtidos de St. Jude Children's Research Hospital: A/turkey/Weybridge/79 (N₁N₁), A/duck/Germany/1215/73 (H₂N₃), A/duck/Ukraine/63 (H₃N₈), A/duck/Czechoslovakia/56 (H₄N₆), A/tern/S. Africa/61 (H₅N₃), A/Sherwater/E. Aust./72 (H₆N₅), A/FPV/Rostock/34 (H₇N₁), A/turkey/Ontario/6118 (H₈N₄), A/turkey/Wisconsin/66 (H₉N₂), A/chiken/Germany/"N"/49 (H₁₀N₇), A/duck/England/56 (H₁₁N₆) e A/duck/Alberta/60/76 (H₁₂N₅).

Soro imune para NDV, utilizado nas reações de imunodifusão dupla e de inibição de hemaglutinação foi obtido no Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia da UFRJ, a partir de frangos inoculados com a amostra-padrão Lasota (20).

O tratamento dos soros para a reação de inibição de hemaglutinação foi feito com RDE (enzima destruidora de receptores), para retirada de inibidores inespecíficos e hemácias de ganso ou cobaio a 50%, para exclusão de hemaglutininas inespecíficas, tratamento feito respectivamente por 60 minutos/temperatura ambiente e 30 minutos/4°C. O processo incluiu inativação a 56°C/30 minutos, obtendo-se finalmente uma diluição de 1:10 (7, 13). Os soros para imunodifusão dupla foram tratados somente por inativação a 56°C/30 minutos (9).

Hemácias, soluções de uso e agarose a 1,5% - Foram utilizadas hemácias humanas e de cobaia e soluções de uso, conforme especificação de Couceiro (7). A solução de agarose a 1,5% foi preparada em PBS, conforme Couceiro (8).

Métodos - A coleta mensal dos materiais fecais das aves era realizada pela manhã, (do fundo das gaiolas, com auxílio de espátula) algum tempo após a limpeza dos viveiros, abastecimento com água e alimentação, afim de se ter certeza da viabilidade viral. As fezes, então, imersas em 5,0ml de solução de Gey ABC com

antibióticos, sendo mantidas em gelo até a chegada ao laboratório (7). Os fragmentos de pulmão da ave morta eram triturados, com auxílio de homogeneizador, em solução de Gey ABC com antibióticos a 10% (p/v), conforme Couceiro (8).

Todos os materiais eram centrifugados a 25000xg (International Refrigerated Centrifuge, Model PR-1), durante 20 minutos a 4°C, separando-se o sobrenadante para inoculação, desprezando-se o precipitado. Os sobrenadantes, quando não inoculados imediatamente, eram conservados a -70°C.

Isolamento - Os materiais sobrenadantes, originários do tratamento das fezes e fragmentos de pulmão coletados, foram inoculados, via amniótica ou alantóica, em ovos embrionados SPF (quatro ovos por material), que eram, a seguir, incubados a 33-35°C, durante 2-3 dias com umidade de 50-60% (7).

Após período de incubação de 72 horas, os líquidos eram coletados, centrifugados a 2500xg (International Refrigerated Centrifuge, Model PR-1) a 4°C/20 minutos e submetidos a reação hemaglutinação para observar a presença de vírus, nos líquidos coletados. Todos os materiais foram passados três vezes em ovos embrionados, com exames, após cada passagem dos líquidos amnióticos e/ou alantóicos coletados; só então se a reação se mostrasse nula, eram considerados os materiais originais como negativos.

Os materiais a serem testados eram diluídos em PBS 7,2 a 4°C, com auxílio de microdiluidores de 25µl (Oxford Laboratories Ltda). Realizavam-se diluições ao dobro num volume de 25µl, de 1:2 até 1:1024. Adicionava-se então, às placas, hemácias de ganso ou cobaio a 0,5% em PBS em volumes de 25µl, incubando-se a 4°C, após agitação. A leitura era feita após 2 horas de incubação, juntamente com os controles. Consideravam-se como positivos aqueles líquidos que levavam a uma hemaglutinação, em títulos iguais ou superiores a 16, tomando-se como título aquele correspondente à maior diluição em que se tinha 100% de aglutinação. Os líquidos positivos foram mantidos em passagem, até que se obtivessem títulos virais hemaglutinantes razoáveis (≥ 256) para o estabelecimento do processo de concentração, na caracterização antigenica das amostras.

Identificação - As amostras isoladas e amostras virais padrões foram concentradas por processo de sedimentação a 50.000xg por 1 hora, com uso de EDTA (16).

Teste de inibição de hemaglutinação - As amostras isoladas e padrões foram submetidas a reação de inibição de hemaglutinação (7, 19), permitindo a identificação de amostras de vírus da doença de Newcastle e do tipo de hemaglutinina de amostras de vírus Influenza.

Teste de inibição de neuraminidase - As amostras isoladas de vírus Influenza foram submetidas a reação de inibição de neuraminidase (16), para tipagem de neuraminidase, com uso de lectina de amendoim e hemácias humanas grupo O a 1%.

Resultados

Foram observados, entre os 360 materiais fecais das aves ornamentais estudadas, isolamentos simultâneos de amostras de vírus Influenza e da doença de Newcastle, em um total de 2 amostras e num percentual de 0,5%. As amostras de vírus Influenza, identificadas pelos testes de Imunodifusão em gel, Inibição de hemaglutinação e Inibição de neuraminidase, mostraram-se como do grupo A dentro do subtipo H₇N₁.

Num único material de necropsia de ave (pulmão) originário de um caso clínico ocorrido durante o mês de outubro de 1981, foram isolados vírus Influenza A do subtipo H₇N₁ e vírus da doença de Newcastle.

Discussão

A circulação simultânea de diferentes vírus, entre aves ornamentais, também detectada pela presença de infecções mistas, tem sido revelada com frequência, na literatura científica mundial (6, 18).

Amostras de vírus Influenza e da doença de Newcastle tem sido detectada, inclusive com isolamento simultâneo, numa larga variedade de espécies de aves, em todo o mundo, causando ou não quadros clínicos (15). Pode ser demonstrado que as amostras variam tanto em relação aos seus抗igenos de superficie, no caso dos vírus Influenza, como quanto no seu poder patogênico, no caso dos vírus da doença de Newcastle. Trabalhos tem sido feitos em todo o mundo, destacando este grande número de tipos de vírus Influenza aviários, muitas vezes simultaneamente presentes, em associação ou não à amostra, velo, meso ou lentogênicas de vírus da doença de Newcastle (3, 5, 14).

Os resultados, por nós obtidos, mostraram a circulação de vírus da doença de Newcastle e vírus Influenza A tipo H₇N₁. Assim como, o fato da nossa coleta ter sido feita em fundo de gaiola, permite-nos dizer, que existe a circulação simultânea destes microorganismos, na comunidade avaliada, já que os materiais fecais de uma mesma série pertenciam, indiscriminadamente, ao grupo de aves que habitavam o viveiro na época da colheita. Especificamente em pássaros ornamentais de gaiolas, como no nosso caso, tem sido observado isolamento simultâneo de amostras incidentes nos vários quadrantes do mundo (10, 11, 12), destacando-se ainda, como por nós revelado, a relação antigenica com amostras humanas, no presente caso com A/FM/1/47 (H₁N₁), dado de importância no estudo da ecologia dos vírus Influenza.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da FINEP e CNPq.

Referências Bibliográficas

1. Abenes, G.B. - Isolation and characterization of Influenza viruses and paramyxoviruses from feral birds, and antigenic differentiation between paramyxoviruses, pigeon-Otaru/76 and dove/Tennessee/75. Jap. Vet. Res., 31:79, 1983.
2. Abenes, G.B.; Okazaki, K.; Fukushi, H.; Kida, H.; Honda, E.; Yagyu, K.; Tsuji, M.; Sato, H.; Ono, E.; Yanagawa, R. & Ymauchi, N. - Isolation of ortho-and-paramyxoviruses from feral birds in Hokkaido, Japan, 1980 and 1981. Jap. J. Vet. Sci., 44:703-708, 1982.
3. Aini, I. & Ibrahim, A.L. - Isolation of Influenza A viruses from domestic ducks in Malaysia. Vet. Rec., 118:130, 1986.
4. Bell, J.G.; Berrada, J.; Wyffels, R. & Houadfi, M.E.L. - Isolation and biological properties of some Moroccan strains of Newcastle disease virus. Avian Dis., 28:319-322, 1984.
5. Boudreault, A.; Lecomte, J. & Hinshaw, V.S. - Charactérisation antigenique des virus Influenza A isolés de oiseaux capturés dans l'Ontario, Le Québec & cols. Provinces Maritimes durant la saison 1977. Rev. Can. Biol., 39:107-114, 1980.
6. Butterfield, W.K.; Yedloutsching, R.J. & Dardiri, A.H. - Isolation and identification of myxoviruses from domestic and imported avian species. Avian Dis., 17:155-159, 1973.
7. Couceiro, J.N.S.S. - Inquérito virológico e sorológico de vírus Parainfluenza em crianças no Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1978. (Tese de Mestrado).
8. Couceiro, J.N.S.S. - Estudo da ocorrência de vírus Influenza A e vírus da doença de Newcastle numa comunidade de aves ornamentais em cativeiro. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1986. (Tese de Doutorado).
9. Dowdle, W.A.; Kendal, A.P. & Noble, G.R. - Influenza viruses. In: - Lennette, E.H. & Schmidt, N.J. - Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5.ed. Washington D.C. American Public Health Association, p.585-609, 1979.
10. Downie, J.C.; Webster, R.G.; Schild, G.C. & Dowdle, W.R. - Characterization and ecology of a type A Influenza virus isolated from a Shearwater. Bull. Wld. Hlth. Org., 49:559-566, 1973.

11. Imada, T.; Yamaguchi, S.; Kawamura, H. & Nerone, K. - Isolation and Influenza A virus from a Bugerigar, *Melopsittacus undulatus*. Natl. Inst. Anim. Hlth. Quaterly, 20:30-31, 1980.
12. Kammen, A. Van - Survey of some poultry viruses in Papua New Guinea. Trop. Anim. Hlth. Prod., 14:109-119, 1982.
13. Machado, R.D. - Observações virológicas e sorológicas em surto de gripe verificado no Estado da Guanabara. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1974. (Tese de Docência Livre).
14. Mackenzie, J.S.; Edwards, E.C.; Holmes, R.M. & Hinshaw, V.S. - Isolation of ortho-and-paramyviruses from wild birds in Western Australia, and the characterization of novel Influenza A viruses. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 62:89-99, 1984.
15. Matsucka, Y. - Isolation of Influenza viruses and a paramyxovirus from caged birds. Jap. J. Vet. Res., 27:29, 1979.
16. McNulty, M.S.; Gowans, E.J.; Houston, M.J. & Fraser, G. - Neuraminidase content of strains of Newcastle disease virus which differ in virulence. J. Gen. Virol., 27:399-402, 1975.
17. Paul, J. - Cell and tissue culture. 5.ed. London, Churchill Livingstone, 1975.
18. Pearson, G.L. & McCann, M.K. - The role of indigenous wild semidomestic, and exotic birds in disease in Southern California, 1972-1973. J. Amer. Vet. Med. Association., 167:610-614, 1975.
19. Sever, J.L. - Application of a microtechnique to viral and serological investigation. J. Immunol., 88:320-329, 1962.
20. Wigg, M.D.; Machado, R.D. & Couceiro, J.N.S.S. - Nova técnica para obtenção de soro imune anti-vírus Influenza. An. Microbiol., 24:135-144, 1979.

METHANE BIOGENESIS AT LOW pH AND NULL ALKALINITY CONDITIONS: I-PERSPECTIVES OF A NEW OPERATIONAL CONCEPT IN THE ANAEROBIC TREATMENT OF INDUSTRIAL WASTEWATERS*

Sergio Luiz Monteiro Salles Filho

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

& Augusto Ferreira da Eira

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

Summary

A new operational concept on the biogenesis of methane by the anaerobic treatment of industrial wastewater, under high volatile acidity, zero total alkalinity and low pH conditions is proposed. This central hypothesis is based on the high adaptive capacity of the microorganisms to environmental conditions and the need to decrease industrial process cost and losses caused by acidity/alkalinity unbalance. The research was performed in a laboratory series of continuous-flow stirred-tank reactors, with a biomass recycling system. The substrate was a wastewater from fiberboard industries submitted at a COD:N:P:40:1:0.2 ratio, and an addition of CaCO_3 at 100mg/l concentration. No other control was adopted to balance the volatile acidity/total alkalinity ratio. Two treatments were carried out, using two kinds of innoculants: one collected from a digester fed with urban sewage sludge and the other from a digester fed with fiberboard wastewater, operated in acid phase. The main research hypothesis was supported during 201 days of laboratory pilot operation to both kinds of innoculants. However, since the maximum level of methane biogas content was unusually over 50% (20 to 25% on the average), the new operational concept must be improved to reach similar standards as conventional methanogenesis patterns.

Resumo

Biogênese do metano em condições de elevada acidez e alcalinidade nula: I. Perspectivas de um novo conceito operacional para tratamento anaeróbio de efluentes industriais

Propõe-se novo conceito operacional para tratamento anaeróbio de efluentes industriais com vistas à metanogênese, sob condições de pH ácido, elevada acidez volátil e alcalinidade total nula. Fun-

* Portion of the first author's MSc thesis in Agricultural Energy, Post-Graduated Course presented at the "Faculdade de Ciências Agronômicas, UNESP, in April, 1985.

damenta-se na elevada capacidade de adaptação dos microrganismos ao ambiente e visa diminuir custos de operação e controle bem como, minimizar as consequências de desequilíbrios entre a acidogênese e metanogênese. Utilizou-se reatores de laboratório ligados em série, alimentados em fluxo contínuo ascendente, com temperatura controlada e reciclagem de lodo. O substrato foi água residual da indústria de chapas de fibras da madeira com correção da relação DQO:N:P à razão de 40:1:0,2, e adição de CaCO₃ à base de 100mg/l. Ressalte-se que não foi adotado nenhum outro tipo de controle para balancear a relação acidez volátil/alkalinidade total. Duas fontes de inóculo foram testadas: uma oriunda de digestor operado com lodo de esgoto urbano e outra, de digestor operado em fase ácida, com água servida. Os resultados obtidos ao longo de 201 dias de operação do protótipo de laboratório confirmaram a hipótese central do trabalho, para ambas as fontes de inóculo. Entretanto, tendo em vista que o teor de metano no biogás raramente superou 50% (em média 20 a 25%), o novo conceito deverá ser submetido a estudos de otimização visando alcançar rendimento similar à metanogênese em pH neutro convencional.

Introduction

The effluents from fiberboards processing show a high polluting potential (15). The main biological systems to treat these organic residuals use organisms of aerobic and anaerobic metabolism. Presently, due to the high operational costs of aerobic systems, mainly, in the aeration and homogenization of the reactors, and due to the possibility of using the methane, the anaerobic biodigestion is being improved to reach similar standards as aerobic processes.

Although the anaerobic treatment of urban sewage is being used for more than a century (12) it was in these last 15 years that it started to be considered as an alternative in the treatment of industrial wastewater (1, 4, 10).

On the other hand, the history evolution of the anaerobic digestion (15) shows that the origins of the current parameters of operation and control of biodigesters are based on the urban sewage sludge and manure treatment. Similarly, the papers about the microbiology of the biodigestion are limited to the ecosystems of the rumen and to biodigesters operated with sewage sludge (6, 8, 13). In this way, the control of the volatile acidity/total alkalinity ratio (between 0,1 and 0,5) as well as the pH (between 6,8 and 7,2) are determined patterns in relation to the papers mentioned above, which limits are considered fundamental to the anaerobic digestion and methanogenesis conduction.

However, these recommendations for phisico-chemical and microbiological control of biodigesters, in spite of their great value, are questionable if we consider its wide applicability to industrial sewage. About this, in 1969, Kotzé and co-workers (10) considered that "in contrast to digestion of domestic sewage sludge, the digestion of many industrial effluents faces difficulties because of the high concentration of volatile acids which may appear during the process". The same authors mentioned the necessity of establishing specific operacional conditions for each kind of residual specially in the case of the ligno-cellulosic of difficult digestion (10, '14). In order to follow the conventional parameters which lead to a good methanogenesis, in these cases, we have to face the difficult task of controlling the pH and the acidity/alkalinity ratio. The frequent incorporation of alkalis, besides making the treatment expensive, makes the biological system sensitive to disequilibrium or collapse, since the process operates under unstable equilibrium conditions artificially created.

Concerning the microbiology of the anaerobic digestion, the papers mentioned reinforce the great capacity of adaptation of the methanogenic bacterias to the environment. So, concerning the habitat, they can be observed growing in soils, swamps, marine sediments, lakes, fish intestines, zooplankton, rumen of herbivorous animals, sludges, sanitary tracts, termite digestive tract, barks and logically,

anaerobic digestors (5, 8, 11). About the temperature there are citations of psychrophilic organisms, growing at 4°C (21) up to thermophilic at 75°C (8). However the range of pH for the methane bacteria growth is narrow as already mentioned before, and variations of more than one unity are not admitted in these values because it may imply no growth at all (9, 11, 12, 13, 16, 18).

Although there has been no description of isolated methanogenic bacterias growing in pH below 6.0, Zinder and Mah (22) studying *Methanosarcina thermophilica*, noticed that up to pH 5.5 this organism could grow. On the other hand, studies in acid phase (6) show methane in biogas under pH 5.7 - 5.9 and relatively low total alkalinity condicitions. In spite of these statements, Zehnder and co-workers (21) mentioned the fact that observations made in acid swamps suggested the formation of methane in pH as low as 3.0. It has not been shown if this phenomenon happens under microenvironments with pH close to neutrality, or because of the existence of acidophilic methanogenic bacteria.

In this work, considering the easy adaptability of the microorganisms to the environment and in order to simplify the operation and control of the anaerobic treatment (shortening costs and acidity/alkalinity unbalance) there was a hypothesis of a new ecological concept to the biogenesis of methane, under "adverse conditions" of acid pH, high volatile acidity and zero total alkalinity, since these are the most frequent natural conditions arising from the industrial wastewater anaerobic treatment.

Material and Methods

The effluent wastewater of the eucaliptus fiberboards industries, shows a ligno-cellulosic organic content with a high percentage of pentosanes (15). The physico-chemical wastewater characteristics was the following: total solids, 7.5g/l (± 2.5); suspended solids, 1.5g/l (± 0.5); COD, 10.000mgO₂/l (± 4.000); dark brown colour (10R 2.5/2 at Munsell soil colour charts, 1975, Ed. Baltimore, Maryland); effluent temperature of 45°C (± 5); total volatile acidity, 450mg/l (± 300); total alkalinity, 15mg/l (± 15); pH 4.0 (± 0.5); COD:N:P ratio 225:1:0.6; and industrial closing system of 7m³/ton wood (± 1).

Weekly portions of industrial sewage were kept at the laboratory at a temperature of 55°C \pm 2°C and, the relation COD:N:P was corrected to the ratio of 40:1:0.2 (15). Up to the 15th day of operation (NH₄)₂SO₄ was used as N source, followed up by NH₄OH. Phosphorus supply was made with KH₂PO₄. Calcium carbonate was also added, in variable quantities according to Table 1 in order to help the decantation without, however, changing the alkalinity in the reactors.

The experimental design was used at random, using 2 inoculum sources (treatments) with 2 repetitions: the first from the biodigester using urban sewage sludge, from the Vila Leopoldina Treatment Station of Sabesp (Sabesp sludge or SS) and the second from the sludge of digesters operated in acidic phase at the Duratex SA industry in Jundiaí (Duratex sludge or DS) which substrate was the sewage itself. In this way, an inoculum was used whose microbial population would be, supposedly, adapted to this effluent. The characteristic of inoculants were the following: a) for SS (Sabesp sludge) - pH 7.0; volatile acidity, 110mg/l; total alkalinity, 1304mg/l; total solids, 42.3mg/l; and asphaltic black colour (7.5 YR - 2/0 to 2.5/0, at Munsell soil colour charts above mentioned); b) for DS (Duratex sludge) - pH 8.3; volatile acidity, 1065mg/l; total alkalinity, 1464mg/l; total solids, 75.9mg/l; and, dark brown colour (5 YR - 2.5/2 to 2.5 YR - 2.5/2, at the Munsell soil colour charts above mentioned). The inoculation was made in an N₂/CO₂ atmosphere with the use of a peristaltic pump at the rate of 200ml of inoculum/reactor (15).

The reactors were made with 4 inch PVC tubes with usable capacity of 2.9l (Figures 1 and 2). Each replication consisted of a set of 4 biodigesters and 1 sedimentation tank in plug flow. The sets of reactors were put in an incubation chamber at 37°C (± 0.6). The laboratory plant was operated automatically in a system of continuous flow, internal stirring, and sludge recycling. The addition of the influent and the sludge recycling were made by peristaltic pumps controlled by

programable digital timers (15). The plug flow system along the sludge recycling was used to study a possible phase separation (6) as well as the higher performance of the plug flow when compared to isolated reactors of the same volume (19). The operational variables are shown in Table 1.

The pH, potentiometric determination, volatile acidity, and total alkalinity follow up Silva (17), while the quantitative and qualitative biogas characteristics were determined through the methodology adapted and described by Salles Filho (15).

The biogas was collected and stored in polyester aluminum - polyethylene gasmeters (15). Their plastic films are flexible, impermeable and heat-sealed and the closure of the inlet/outlet biogas system is made by sillicone rubber (Figures 1 and 2).

Table 1 - Operational conditions of the pilot plant for the fiberboard wastewater anaerobic treatment.

Symbols: (1*) = According to Silva (17); (**) = Paralyzation of the system for 11 days due to changes in the influent admission

Operational condition	Time (days) from/to	At	pH	COD *1	Organic loading rate (kg COD IN/ m ³ . day)	Gh (days)	CaCO ₃ (mg/l)	Admission flow (l/h)	Recycling flow (l/h)
1	0 to 08	8	5,25	6.156	0,307	20,0	500	0,0302	0,0100
2	9 to 10	2	5,25	6.156	0,615	10,0	340	0,0604	0,0100
3	11 to 12	2	5,25	6.156	0,615	10,0	350	0,0604	0,0130
4	13 to 15	3	5,15	10.185	1,011	10,0	340	0,0604	0,0130
5	16 to 18	3	5,15	10.185	1,011	10,0	137	0,0604	0,0130
6	19 to 25	7	5,10	8.092	0,808	10,0	137	0,0604	0,0130
7	26 to 28	3	5,90	9.520	1,903	5,0	100	0,1208	0,0130
8	29 to 40	12	5,70	12.664	2,532	5,0	100	0,1208	0,0130
9	41 to 45	5	5,70	12.664	2,834	4,5	100	0,1350	0,0130
10	46 to 48	3	5,20	12.664	2,834	4,5	100	0,1350	0,0130
11	49 to 59	11	-	-	-	-	-	zero(**)	-
12	60 to 67	8	5,20	10.499	2,345	4,5	100	0,1350	0,0130
13	68 to 74	7	5,20	10.499	2,345	4,5	50	0,1350	0,0130
14	75 to 77	3	5,10	10.499	2,345	4,5	50	0,1350	0,0125
15	78 to 82	5	5,10	8.752	1,955	4,5	50	0,1350	0,0125
16	83 to 90	8	4,75	7.040	1,573	4,5	50	0,1350	0,0125
17	91 to 96	6	4,30	7.040	1,573	4,5	50	0,1350	0,0125
18	97 to 104	8	5,35	9.944	2,222	4,5	100	0,1350	0,0125
19	105 to 111	7	4,80	9.944	2,222	4,5	100	0,1350	0,0125
20	112 to 118	7	4,40	9.944	2,222	4,5	100	0,1350	0,0125
21	119 to 126	8	5,70	11.508	2,571	4,5	150	0,1350	0,0125
22	127 to 130	4	5,70	11.508	2,571	4,5	150	0,1350	0,0150
23	131 to 138	8	4,70	11.508	2,571	4,5	150	0,1350	0,0150
24	139 to 140	2	5,10	11.508	0,575	20,0	100	0,0300	0,0150
25	141 to 148	8	5,10	9.660	0,483	20,0	100	0,0300	0,0150
26	149 to 152	4	5,20	9.660	0,508	19,0	100	0,0320	0,0150
27	153 to 160	8	5,20	9.660	0,578	16,7	100	0,0360	0,0100
28	161 to 167	7	5,00	9.660	0,662	14,6	100	0,0410	0,0100
29	168 to 173	6	5,00	9.660	0,833	11,6	100	0,0520	0,0100
30	174 to 177	4	5,30	9.660	1,017	9,5	100	0,0630	0,0120
31	178 to 178	1	5,30	9.660	0,483	20,0	100	0,0300	0,0120
32	179 to 185	7	5,70	12.159	1,253	9,7	100	0,0620	0,0120
33	186 to 193	8	5,70	12.159	1,253	9,7	100	0,0620	0,0150
34	194 to 201	8	5,60	12.159	1,643	7,4	100	0,0820	0,0150

Figure 1 - Laboratory pilot plant details for the continuous anaerobic treatment of fiberboard wastewater (compare Figure 2).

Symbols: A = Incubation chamber general aspects (16) - gasmeters (11) - water seal (10) - effluent outlet boxes (7) sludge recycling pump (12); B = Collective system of the effluent outlets; C = Incubation chamber internal view (16) - biodigesters (5) - sedimentation tank (6) - sample points (T1 to T4) - oil seal of the reactors (os); D = Overview of the effluent outlet box (7); E = Sedimentation tank (6) - oil seal and connection tube from the gas chamber (gc) to the gasmeter - sample points (T1, T2, T3 and T4)

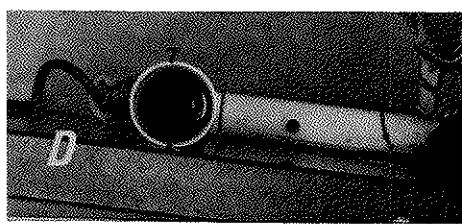
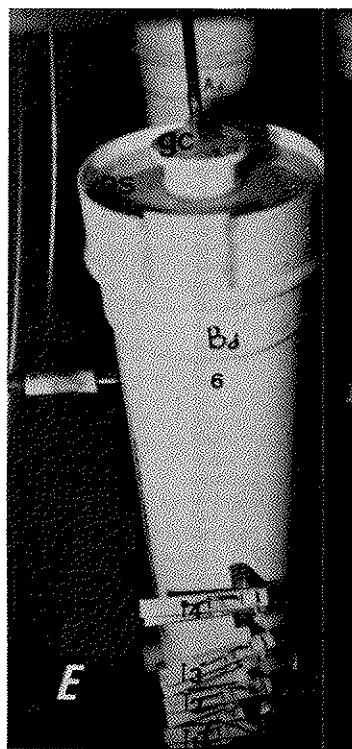
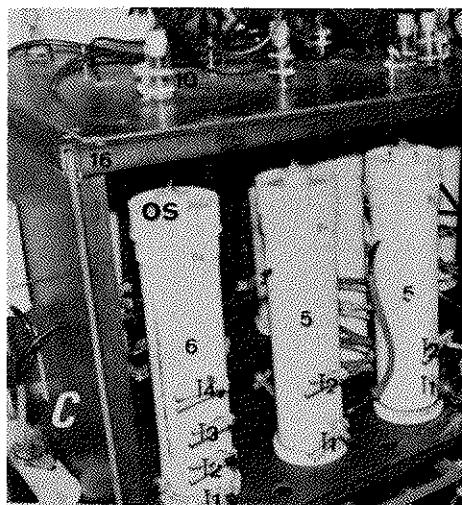
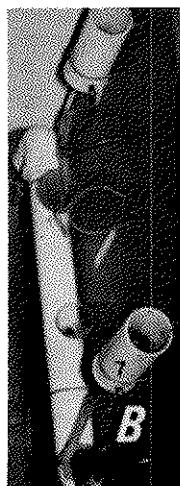
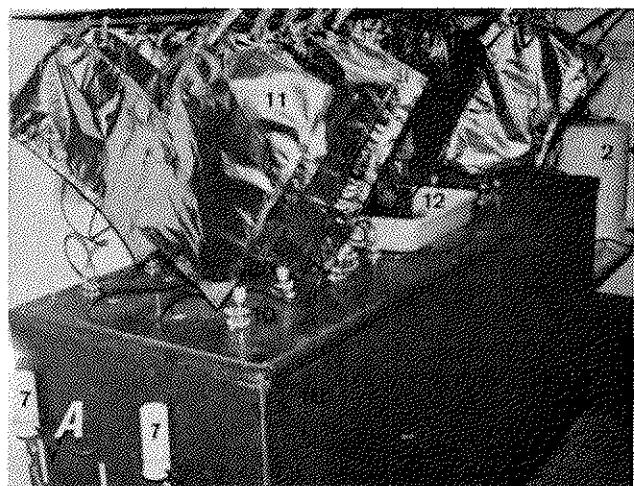
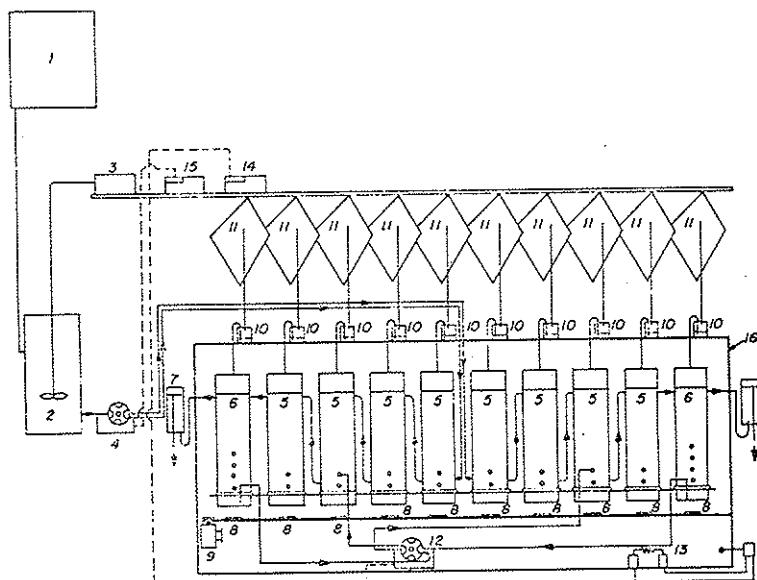


Figure 2 - The laboratory plant flow diagram (partial view of two sets).

Symbols: 1 = Storage tank (500l); 2 = Buffer tank (50l); 3 = Buffer tank stirring; 4 = Influent peristaltic pump; 5 = Biogesters; 6 = Sedimentation tanks; 7 = Effluent outlet boxes; 8 = Magnetic stirring; 9 = Traction motor of the belt-operated magnetic stirring; 10 = Water seal; 11 = Plastic film gas-meters (flexible, impermeable and heat-sealed); 12 = Sludge recycling peristaltic pump; 13 = Incubation chamber heating system; 14 = Admission control timer; 15 = Recycling control timer; 16 = Uncubation chamber with controlled temperature



Results

Figures 3 and 4 show respectively, the pH evolution and the volatile acidity and total alkalinity as affected by the incubation time. Also in these Figures, the variations of the hydraulic retention time (Oh) and the organic loading rate (OLR) during the experiment can be observed.

Figure 5 shows the linear correlation between the volatile acidity of the two treatments SS and DS. The characteristics of the biogas as well as the biogas yield are shown in Figure 6. The variations of the organic loading rate and Oh in the incubation period are shown in Figure 6. Up to the 60th day of operation, the methane was not analysed due to the lack of an adequate analysis. Although the method of combustion in ORSAT apparatus has been indicated as appropriate (20), incomplete and inconstant combustion of the mentioned gas was observed, as a result of variations in the relative carburettant mixture concentration. This aspect led to the development of an appropriate analysis for methane combustion (15).

Discussion

The hypothesis of promoting the methanogenesis under conditions of high volatile

acidity, zero total alkalinity and acid pH in contrast to the traditional recommendations (9, 10, 11, 12, 16, 18), will be discussed.

Evolution of pH, volatile acidity and total alkalinity parameters - The results of pH (Figure 3) show a tendency of the 2 treatments in converging to values close to 4.0, although the inoculum has shown very distinct initial characteristics. These values are out of the accepted, as the essential range for methanogenesis is from 6.8 to 7.2 (1, 9, 10, 12, 16, 18).

The explanation for the natural tendency of the medium acidification seems to be partially connected to acid pH of the wastewater and to its high buffering capacity due to lignocellulosic residues (8, 10, 11). In fact, the variations of Q_h and organic loading rate, volatile acidity (Figure 4) and of the CaCO_3 dosage from 50 to 500mg/l, did not affect the pH of the influent (Table 1) as well as in the reactors.

Conversely to the pH stability, the volatile acidity show great oscillations for SS as well as DS treatments, as shown in Figure 4. The values obtained exceeded the "ideal range" (50 to 300mg/l) recommended by the literature (9, 10, 16). Additionally the comparative evolution of the volatile acidity for the 2 treatments (SS and DS) in Figure 5 were highly correlated, and it leads to the inference that there are a similarity in the sources of inoculum with respect to volatile acid formation during the experimental period of 201 days.

The results of the total alkalinity (Figure 4) tended to zero in spite of the recommendation to maintain the volatile acidity/total alkalinity ratio below 0.3. About this aspect Stein and Malone (18) propose the ideal range of this ratio within 0.1 and 0.3; considering 0.4 stress; 0.5 would indicate disturbances and 0.8 collapse, with paralisation of the methanogenic activity. As the values for total alkalinity were close to zero, the ratio assumes very high values. So, according to the literature, the reactors were operated under extremely unfavorable conditions (12).

Production of biogas and methanogenesis - As described in the literature, in this experiment the gases that showed more abundance were CO_2 and CH_4 (1, 9, 12, 13, 16, 21). The hydrogen gas, however (Figure 6), showed values above the percentages normally described by the authors mentioned above (20% for SS and 25% for DS in the beginning of the experiment) except for a digestibility test made for this kind of wastewater (7) which indicated the presence of 22.0% of H_2 .

According to Figure 6, the methane gas was detected in percentages higher than 50% but with great fluctuation in such a way that in the average, the content was below those mentioned in the literature. The content of 50% of CH_4 normally shows satisfactory digestion for substrates as sewage sludge, farm manures, sugary and starchy residuals (3, 9) but this is not true for all types of residues (14). The average around 20% and 25% of CH_4 for the treatments SS and DS respectively,

Figure 3 - pH evolution in the SS (SABESP sludge) and DS (Duratex sludge) treatments within incubation time; hydraulic retention time variations (Q_h , days) and organic loading rate (OLR, Kg COD/m³.day) during the experiment

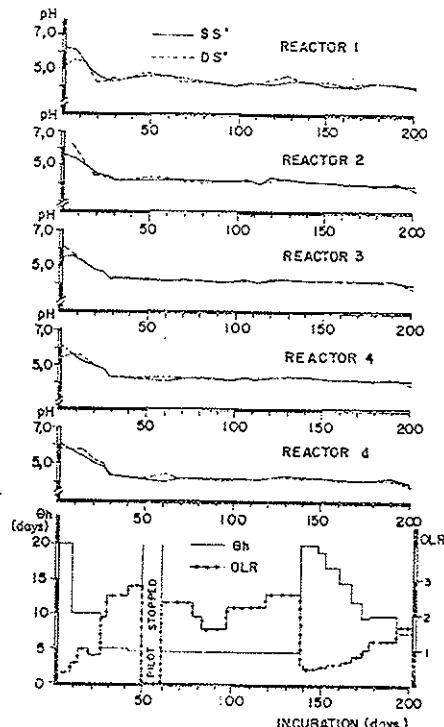
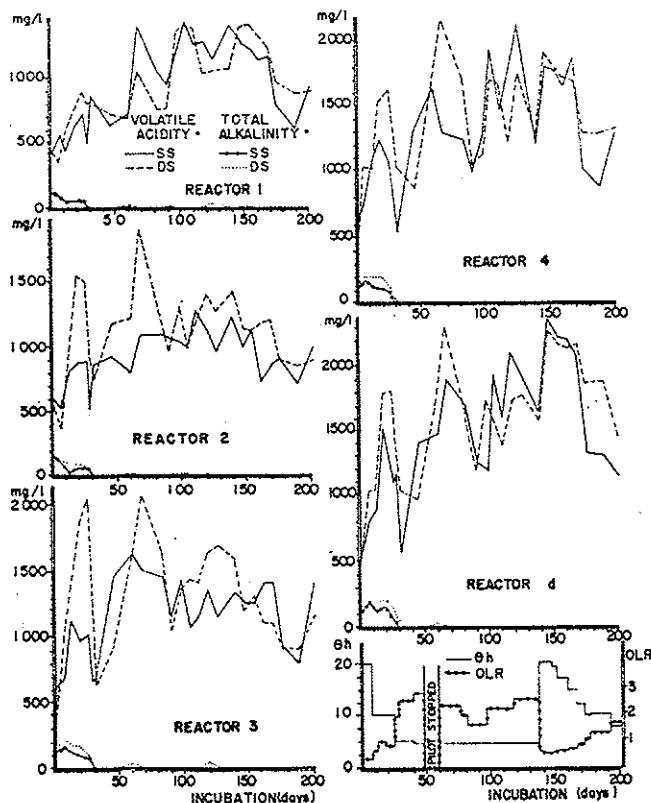


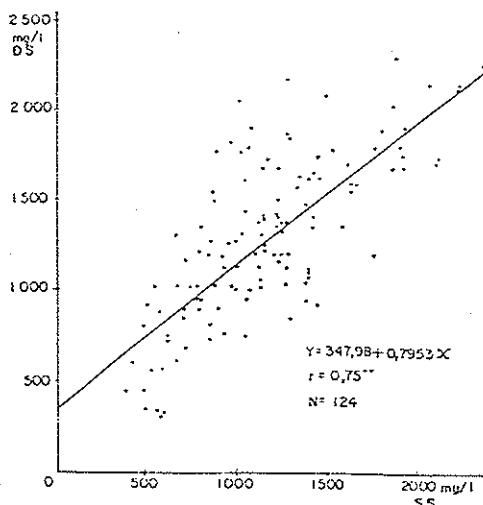
Figure 4 - Volatile acidity evolution (mg/l of total volatile acids, as acetic acid), and total alkalinity (mg/l as CaCO_3) in the SS (SABESP sludge) and DS (Duratex sludge) treatments, considering incubation period; hydraulic retention time variations (0h, days) and organic loading rate (OLR in kg COD/m³. day) during the experiment. * Average data of two replications. Symbols: Reactors 1, 2, 3, 4 = Serial biodigesters (plug flow); Reactor d = Sedimentation tanks connected to biodigesters



although reduced on comparison to the contents mentioned above, can represent acceptable levels for this kind of residue in continuous flow operation basins, since Hirata's experiences (7) with fiberboard wastewater anaerobic digestion, carried out in lab batch reactors and within the conventional ecologic concept of methanogenesis obtained only 44.6% of CH_4 in the biogas. On the other hand, the results obtained by Ghosh and coworkers (6), with methane generation in acid phase (19 to 44%), under pH 5.7 - 5.9 and relatively low total alkalinity conditions (about 790mg $\text{CaCO}_3/1$), although in agreement with the present results, did not introduce the same possible role of these acidophilic methane bacteria as the basis for a new operational concept on methane biogenesis proposed in this work.

The productivity of biogas (Figure 6) also remained below those cited in the literature, probably because of the specific wastewater characteristics already discussed. At this rate the necessity of further study in order to optimize the process under this new operational concept must be considered.

Figure 5 - Regression analyses and linear correlation of the volatile acidity data (in mg/l of total volatile acids, as acetic acid) comparing SS (SABESP sludge) and DS (Duratex.sludge) treatments



About the sources of inoculum used, one can say, that in the Sabesp sludge (SS) the presence of methanogenic bacteria was considered as certain (although it was not known if they would resist to the adverse environment), however in the Duratex sludge (DS), there was not such a certainty. The occurrence of methanogenic bacteria in the DS inoculum (Figure 6) may be explained by the following hypothesis: contamination of the inoculum source and/or natural occurrence of methanogenic bacteria in barks (*Methanobacterium arbophilicum*, 11) and/or occasional natural inoculation.

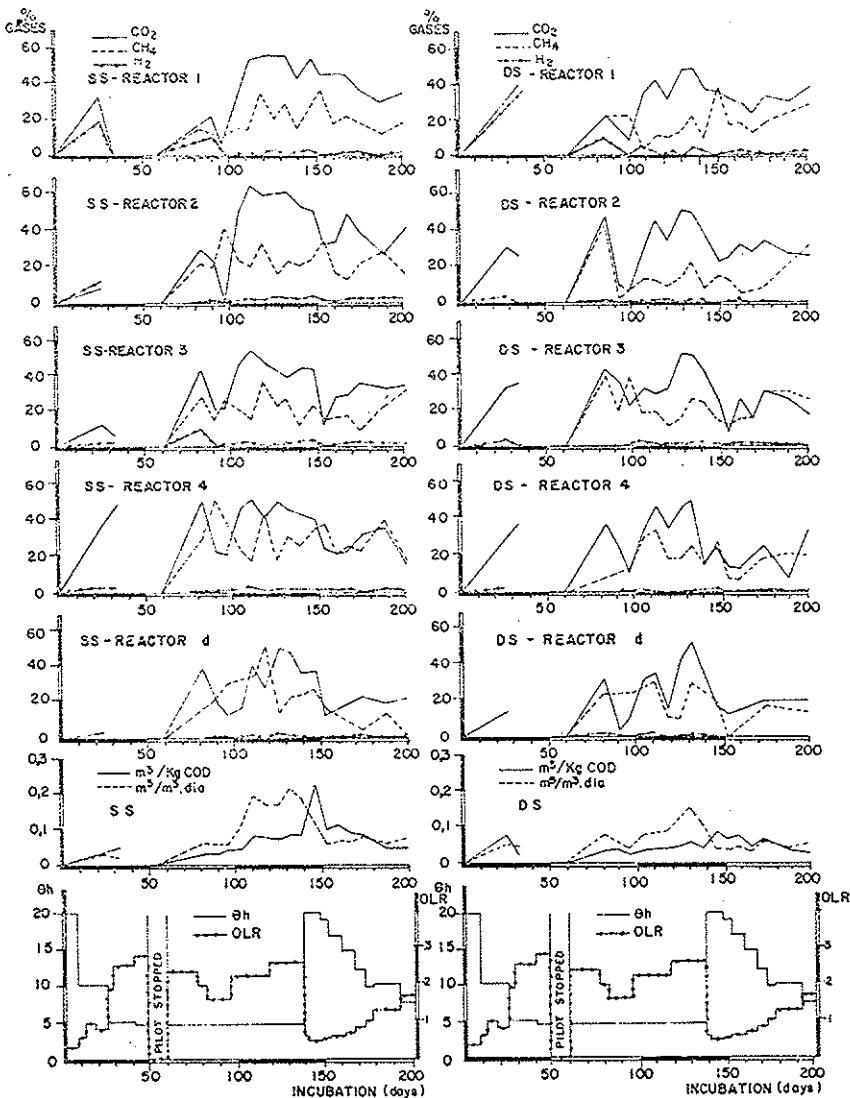
The great microorganism adaptative potential to uncommon situations has brought some hypotheses about their limits of action. Natural and synthetic compounds originally absent in the biosphere are now used as substrates for several microbial species (2).

So, the phenomenon observed in this work, involving the methanogenesis at pH 4.0, volatile acidity above 2.400 mg/l and zero total alkalinity contributed to opening a new field in anaerobic digestion. Specifically, in the anaerobic treatment, although the efficiency of the process has not been the object of this work, reasonable treatment levels for this kind of residue were obtained under simpler operational conditions, and, probably, less expensive costs than those have recommended since 100 years ago in the literature (12). In this way, the chemistry and microbiology of the anaerobic biodigestion have their field of study amplified through the confirmation of the phenomenon of methane generation in acid pH, which had been empirically observed in swampy environments (21) and in acid phase anaerobic digestion, mentioned above (6).

Finally, it is necessary to say that the attempt of standardization of the biological phenomena meets obstacles which go further than the human will and touch distant frontiers not easily dominated, such as, life itself.

Figure 6 - CO₂, CH₄ and H₂ content evolution in the biogas of the SS (SABESP sludge) and DS (Duratex sludge) treatments and biogas productivity (TPNC) evolution during incubation time; hydraulic retention time variations (Oh, days) and organic loading rate (OLR) in Kg COD/m³. day) during the experiment. * Average data of two replications.

Symbols: Reactors 1, 2, 3, 4 = Serial biodigesters (plug flow); Reactor d = Sedimentation tanks connected to biodigesters



Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Duratex SA, CNPq, ITAL Campinas, Brasmetano, Mr. Joaquim da Silva and Sabsesp for their cooperation in this research.

References

1. Barbosa, R.A. Geração de metano através da biodigestão anaeróbica de vinhotto de caldo de cana-de-açúcar em reator de fluxo ascendente. In: Encontro Nacional

- sobre tecnologia do tratamento do vinhoto, II, Maceió, 1982. Rio de Janeiro, Ibrasa, p.1-22, 1982.
2. Cavett, J.J. & Woodrow, M.N. - A rapid method for determining degradatation of plasticised P.V.C. by microorganisms. Proc. First Int. Biodeterior Symp., 1968.
 3. Cohen, A.; Zoetemeyer, R.J.; Van Deursen, A. & Van Andel, J.G. - Anaerobic digestion of glucose with separated acid production and methane formation. Water Res., 13:571-581, 1979.
 4. EMBRATER - Serviço de extensão rural: bibliografia sobre biogás. 2^{ed}. Brasília, DF. Série Bibliografias, 23:50p, 1984.
 5. Fannin, K.F.; Conrad, J.R.; Jerger, D.E.; Srivastana, V.; Ghosh, S. & Chynoweth, D.P. - Anaerobic processes. Water Poll. Cont. Feder., 53:711-720, 1981.
 6. Ghosh, S. & Klass, D.L. - Two-phase anaerobic digestion. In: - Symposium papers: clean fuels from biomass and wastes, Orlando, 1977. Chicago, Institute of Gás Technology, p.373-415, 1977.
 7. Hirata, Y.S. - Teste de digestibilidade em condições anaeróbicas e análise químicas. São Paulo, Instituto de Pesquisas Tecnológicas, Relatório n° 16.124, p.1-13, 1981.
 8. Hungate, R.E. - The microbiology of bio-digestion. In: Simpósio Latino-americano sobre produção de biogás, I, São Paulo, 1982, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Comitê Latino Americano de Microbiologia Ambiental, p.1-91, 1982.
 9. Keenan, J.D. & La Grega, M.D. - Control of anaerobic digester operation. In: - Annual conference of water pollution control association of Pennsylvania, 48th, Pennsylvania, 1976. Pennsylvania, Water Pollution Control Association of Pennsylvania, P.1-28, 1976.
 10. Kotzé, J.P.; Thiel, P.G. & Hatting, W.H.J. - Anaerobic digestion. II - The characterization and control of anaerobic digestion. Water Res., 3:459-494, 1969.
 11. Mah, R.A.; Ward, D.M.; Baresi, L. & Glass, T.L. - Biogenesis of methane. Ann. Rev. Microbiol., 31:309-341, 1977.
 12. McCarty, P.L. - One hundred years of anaerobic treatment. In: - Hughes, D.E. & col., eds. - Anaerobic Digestion. New York, Elsevier Biomedical Press, p.3-22, 1982.
 13. Peres, C.S. - Microbiologia da digestão anaeróbica. In: - V Simpósio nacional de fermentação, Viçosa, 1982. São Paulo, Sociedade Brasileira de Microbiologia, p.1-40, 1982.
 14. Pfeffer, J.T. & Khan, K.A. - Microbial production of methane from municipal refuse. Biotechnol. Bioengin., 18:1179-1191, 1976.
 15. Salles Filho, S.L.M. - Um novo conceito operacional na biogênese do metano. Botucatu, Faculdade de Ciências Agronômicas UNESP, 1985. (Tese de Mestrado).
 16. Schroeder, E.D. Anaerobic process. In: - Schroeder, E.D. - Water and wastewater treatment. New York, McGraw Hill, p.313-337, 1977.
 17. Silva, M.O.S.A. - Análises físico-químicas para controle das estações de tratamento de esgotos. São Paulo, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, 1977.
 18. Stein, R.M. & Malone, C.D. - Anaerobic digestion of biological sludges. Environ. Technol., 1:571-588, 1980.
 19. Tchobanoglous, G. Wastewater engineering: treatment disposal, reuse. New York, McGraw-Hill Book, 1979.
 20. Wilson, C.W. - Fuel gases and related products. In: - Welcher, F.J. - Standard methods of chemical analysis-industrial and natural products and noninstrumental methods. 6^{ed}. New York, Ed Van Nostrand Reinhold, p.1507-1562, 1963.
 21. Zehnder, A.J.B.; Ingvorsen, K. & Marti, T. - Microbiology of methane bacteria. In: - Hughes, E.D. & col., eds. - Anaerobic Digestion. New York, Elsevier Biomedical Press, p.45-68, 1982.
 22. Zinder, S.H. & Mah, R.A. - Isolation and characterization of a thermophilic strain of *Methanosarcina* unable to use H₂-CO₂ for methanogenesis. Appl. Environ. Microbiol., 38:996-1011, 1979.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Boletim da Sociedade Brasileira de Virologia

Trata-se de publicação que contém informações provenientes da Diretoria da SBV, além de apresentar um espaço destinado aos associados e interessados em divulgarem suas informações (Vírus-Lances).

Até o momento 2 Boletins foram impressos. O primeiro comunica a legalização da Sociedade, o Encontro de Virologia do Nordeste (Virológica 87) e o cadastro de virologistas (Quem é quem). Há um agradecimento à Sociedade Brasileira de Microbiologia na pessoa de seu antigo presidente, João Salvador Furtado que propiciou os primeiros Encontros Nacionais de Virologia, incentivando o Plano Setorial de Virologia (PSV), de maneira a auxiliar a sua penetração na FINEP. O 2º Boletim informa a aprovação, na FINEP, do PSV representado pela Virologia Básica, Virologia Humana, Virologia Animal, Virologia Vegetal e Virologia de Invertebrados, obtendo a concessão de 350.000 O.T.N.

Os virologistas interessados poderão requisitar cópias dos formulários para a apresentação de Projetos diretamente na FINEP, obedecendo as seguintes áreas prioritárias:

Área básica: Estrutura da partícula viral; replicação de vírus DNA e RNA; genética de vírus bacteriano, de animais e de plantas; imunoquímica dos componentes virais; fenômenos decorrentes da interação vírus-célula; patogenicidade experimental.

Área animal Bovinos: leucose; vírus respiratórios e vírus entéricos; **Suínos:** Doença de Aujeszky; gastroenterite transmissível; rotavírus.

Aves: Doença de Marek; vírus entéricos; doença de gumboro e bronquite infecciosa.

Área humana: gastroenterites virais, cujo projeto deve ser estendido ao triênio 87/89; hepatites virais, a ser implantado a partir de 1987 por um período inicialmente definido de 3 anos; viroses transmitidas através de produtos de origem sanguínea, em particular a síndrome de imunodeficiência adquirida, viroses respiratórias e congênitas, cujas importâncias, dentro do quadro nacional recomendam a elaboração de projetos específicos, visando obter subsídios a seu controle. Estes projetos deverão ser implantados a partir de 1987.

Área de invertebrados: vírus com bioinseticidas;

Área vegetal: virose das fruteiras; virose das leguminosas alimentícias e virose das hortaliças.

No espaço Vírus-lances encontram-se algumas das informações relativas ao Virológica 87, além de alguns avisos de interesse geral dos Virologistas associados.

Sociedade Brasileira de Virologia: Deptº de Virologia/

Fundação Oswaldo Cruz

Av. Brasil, 4365

21040 Rio de Janeiro RJ

Maria José de Oliveira Ângelo
Deptº de Microbiologia do ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP

Diagnóstico das bacteriemias

A partir da clássica revisão de métodos tradicionais ou convencionais para processamento de hemoculturas editada por Washington II (32) tem havido uma preocupação periódica em revisar novas propostas sobre a matéria. Uma revisão recente devida a Stevens (30) aborda de modo sumário os métodos atualmente disponíveis para a detecção de bacteriemias. Além de reportar-se aos métodos convencionais discute algumas técnicas mais recentemente comercializadas, particularmente, os sistemas bifásicos ("Septi-check" BCB, Roche), o método

radiométrico "Bacter", o sistema da DuPont designado "Isolator lysis-centrifugation", e o método de monitorização por alterações de condutância-impedância de corrente alternada entre eletródios ("Bactometer", McDonnell Douglas Health Systems). Referencia ao ARD ("Antimicrobial Removal Device", Marion Scientific) também consta do relato.

No relativo a quaisquer desses sistemas há, ao final, breve menção aos cuidados e exigências sobre a inspeção para averiguar o crescimento, o cultivo de anaeróbios e microrganismos menos frequentes em hemoculturas, a avaliação de resultados falso-positivos (taxas de contaminação) e o volume de sangue a ser cultivado.

Essa pequena revisão, embora atualizada, quase nada acrescenta a duas revisões mais completas e um pouco anteriores que foram editadas respectivamente por Gould (9) e por Ballows & Tilton (1). Na revisão de Stevens (30) há no entanto referência a um dos métodos bifásicos ("Septi-Check", Roche) que voltam a ser reconsiderados e que se inspiram em princípio há muito desenvolvido no cultivo de *Brucella* e que se tornaram conhecidos no Brasil como o "frasco de Castaneda". Weinstein (36) avalia também sistema desse tipo. A revisão editada por Ballows & Tilton (1) embora inclua parte substancial na discussão de culturas de sangue, estende-se também sobre aspectos bacteriológicos relacionados com outros fluidos corpo reos.

Pode-se dizer, de acordo com os trabalhos citados, que exceto pelas propostas de sofisticação tecnológica para triagem e detecção precoce de hemoculturas positivas, nada há de inteiramente renovador, em relação aos métodos tradicionais, permanecendo como não revogadas observações mais antigas, sobre os aspectos a seguir:

a) O volume de sangue semeado tem uma influência decisiva no índice de positividade real das hemoculturas (30). Na maioria dos estudos comparativos de mais de um sistema, raramente se avaliou se a maior positividade não se deveu à distribuição de um maior volume global de sangue entre os diversos meios (6). Esse princípio compromete a sensibilidade de alguns métodos automatizados ou que implicam em manipulação que não permite volumes sanguíneos maiores como o sistema de lisefiltração (9).

b) Além do volume de sangue semeado, nenhum método pode ser melhor, automatizado ou não, que a oferta nutritiva do meio de cultura empregado (22, 30). Todos os sistemas dependem do crescimento dos microrganismos em caldo. A diferença entre eles decorre da maneira como se detecta o crescimento bacteriano. O sistema ótimo seria capaz de detectar rapidamente a presença de microrganismos, pelo menor custo, e atuaria em contrário à contaminação dos espécimes nas diversas etapas de colheita e manipulação (30). No estágio atual todos os sistemas oferecem vantagens ou desvantagens. Não há um meio universal que atenda às exigências de quaisquer microrganismos prováveis (22). Só a diversificação de meios e sistemas, com o ônus implícito dos custos, permite os melhores índices de crescimento, mas geram o problema de distinção entre isolamentos significativos ou não, como veremos adiante. Quase todas as comparações de sistemas inovadores admitem a sua eficácia quando em justaposição a sistemas convencionais, para determinados grupos de microrganismos, destacando-se os anaeróbios (4, 11, 35, 36).

c) Não existe o anticoagulante universal inócuo para o esperado crescimento bacteriano. A preferência para o polianetolsulfonato de sódio (SPS, "Liquoid", Roche) nas concentrações entre 0,025 a 0,05% é no entanto, evidente (59). Assinalam-se outros anticoagulantes como de maior toxicidade (9). Outros autores, entretanto, revelam, a toxicidade do SPS para diversos germes, particularmente *Neisseria*, o que é importante (7, 8, 21, 27, 29). O efeito tóxico do SPS nesses casos poderia ser revertido pela adição de gelatina a 1% ao meio de cultura (21, 29), ou pela incorporação de 30% de sacarose (24).

As concentrações entre 10 a 20% de sacarose que são habitualmente empregadas nos meios hipertônicos aparentemente não foram avaliadas quanto a esse propósito. Por sua atividade antimicrobiana a heparina não parece indicada (23) e os sais orgânicos empregados no passado, particularmente o citrato, não têm sido recentemente investigados.

Como fato importante para o nosso ambiente a incorporação de bile de boi nas hemoculturas para o diagnóstico de febre tifóide, e eventualmente de outras salmoneloses, permanece com o caráter de indicação específica. Evita contaminantes,

antagoniza fatores antibacterianos do sangue e, mesmo usada pura, na proporção de 10% em relação ao sangue, faculta o isolamento (12).

d) Concernente ao problema de evitar a interferência de fatores antimicrobianos, particularmente derivados do tratamento prévio dos pacientes, tem-se advogado o emprego de meios de cultura com compostos redutores que antagonizariam a ação de alguns antibióticos. Particularmente investigados têm sido o tioglicolato, a cistina e o "Thiol Broth". Esses mesmos compostos também mostram toxicidade para alguns microrganismos (9) ou demonstram-se, como a cisteína, ineficazes para o propósito (33). Para a família de antibióticos beta-lactâmicos estudo recente comprova a eficácia do "Thiol Broth" (34). Contudo, esse meio foi menos eficaz para isolamentos que o caldo-tripticase-soja, em uma longa série de hemoculturas de rotina, também recentemente descrita (17).

Há resultados satisfatórios descritos com o emprego de resinas para a remoção de certos antibióticos (34) que são, entretanto, menos evidentes em condições indiscriminadas de outras rotinas (11).

É antiga a recomendação do emprego de beta-lactamasas para antagonizar os antibióticos correspondentes, nas condições de cultivo. Todavia com o conhecimento atual da multiplicidade dessas enzimas e de seus respectivos substratos de emprego clínico, não há condições de uniformidade e de invariabilidade, em apoio da técnica. Relatos recentes não parecem disponíveis.

Aparentemente a diluição do sangue semeado entre 1:10 a 1:30 em proporção ao meio de cultura é o processo mais seguro de contornar fatores inibitórios do crescimento bacteriano intrínsecos ou extrínsecos ao sangue. Nesse sentido os resultados dos métodos convencionais são semelhantes e/ou complementares das propostas inovadoras, ressalvado talvez serem mais lentos para detecção dos resultados (9, 30).

Também o emprego da lise-filtração e da lise-centrifugação mostrou resultados que implicaram em complementação pelos métodos convencionais, ao custo eventual de maior número de isolamentos falso-positivos (4, 22).

e) A possibilidade do encontro de amostras ósmoticamente sensíveis (formas L) de bactérias, introduziu o emprego de meios hipertônicos, com a adição de sacarose entre 10 a 20% nos caldos nutritivos usuais em hemoculturas (6, 25). Tornou-se aparente, em termos de detecção das bacteriemias que o rendimento desses meios é de pouca ou nenhuma significação (19). Lauria (13) em 600 exames assinala apenas 16 isolamentos que se podem considerar significativos pelo emprego de meio hipertônico. Entretanto levanta questões importantes: não se sabe se as formas consideradas defectivas pelas condições de isolamento, se são apenas indicadoras do organismo patogênico parental, se são responsáveis pela persistência da infecção, ou se são, por si mesmas, patogênicas. No homem, além de *Streptobacillus* a patogenicidade dessas variantes nunca foi provada de forma convincente. Os casos positivos corresponderam à suspeita de endocardite ou meningite não provadas pelos métodos convencionais.

É possível, todavia, que os meios hipertônicos tenham mais significação para o cultivo a partir de outros líquidos corporeos, que não o sangue (3, 26). Sobre se o efeito benéfico eventualmente encontrado, dependa apenas da hipertonidade do meio, permanece questionável (10).

f) Sobre o tempo dedicado à observação das culturas atinge-se ao consenso sobre que a observação não se deva estender por mais de 7 dias (9, 17). Em 259 episódios de bacteriemias observadas por Raddi & Suassuna (20) nenhum ultrapassou esse limite quanto a positividade (Comunicação pessoal). Isto pode, naturalmente, não se aplicar a patógenos especiais, como *Mycobacterium* do complexo avium, atualmente frequentes em pacientes com a síndrome de imunodeficiência adquirida. Uma proposta metodológica nesse sentido foi feita por Berlin & col. (2). É entretanto pertinente lembrar que repiques precoces com quatro (18) ou seis horas (28) podem fornecer um número substancial de resultados positivos, antecipando as habituais 24-48 horas. As frequências de positividade são aparentemente comparáveis com dados da literatura obtidos por bacterioscopia precocemente realizadas (15).

Técnicas indiretas, não fundamentadas no cultivo e isolamento de microrganismos têm sido propostas, mas a sua avaliação é ainda insuficiente ou não satisfatórias (31).

g) Com as técnicas tradicionais, ou com algumas das técnicas inovadas permanece o

problema de avaliar quando o isolamento pode ser considerado clinicamente significativo. Entre as últimas, algumas implicam em um maior número de isolamentos de germes como os estafilococos coagulase-negativos ou germes difteróides, contaminantes habituais, mas cujo significado tem-se firmado em alguns casos (30). A interpretação e o controle desses resultados têm gerado pontos de vista não inteiramente superponíveis (9, 14), permanecendo a cuidadosa avaliação clínica, possivelmente, como o melhor e único parâmetro para a consideração desses achados.

Referências

1. Ballows, A. & Tilton, R.C. (Eds) *Body fluids and infectious diseases*. Amer. J. Med. 75 (Suppl. 1B): 1-148, 1983.
2. Berlin, O.G.W.; Zakowski, P.; Bruckner, D.A. & Johnson, Jr., B.L. New biphasic culture system for isolation of mycobacteria from blood of patients with acquired immune deficiency syndrome. J. Clin. Microbiol., 20:572-574, 1984.
3. Bridger, R.C. Demonstration of pathogenic bacteria in "sterile" inflammatory exudates. J. Clin. Pathol., 36:454-458, 1983.
4. Chan, R.; Munro, R.; Tomlinson, P. Evaluation of lysis filtration as an adjunct to conventional blood culture. J. Clin. Pathol., 39:89-92, 1986.
5. Edberg, S.C.; Bottenbly, C.J. & Gam, K. Use of sodium polyanetholsulfonate to selectively inhibit aminoglycoside and polymyxin antibiotics in a rapid blood level antibiotic assay. Antimicrob. Ag. Chemoth., 9: 414-417, 1976.
6. Ellher, P.D.; Kiehn, T.E.; Beebe, J.L. & McCarthy, L.R. Critical analysis of hypertonic medium and agitation in detection of bacteremia. J. Clin. Microbiol., 4:216-224, 1976.
7. Eng, J. Effect of sodium polyanethol sulfonate in blood cultures. J. Clin. Microbiol., 1:114-123, 1975.
8. Eng, J. & Iveland, H. Inhibitory effect of sodium polyanethol sulfonate on the growth of *Neisseria meningitidis*. J. Clin. Microbiol., 1:444-447, 1975.
9. Gould, J.C. & Duerden, B.I. (Eds). *Blood culture-current state and future prospects*. J. Clin. Pathol. 36:963-977, 1983.
10. Hall, M.M.; Mueske, C.A.; Ilstrup, D.M. & Washington III, J.A. Evaluation of vented blood culture media with sorbitol. J. Clin. Microbiol., 10:690-692, 1979.
11. Hansen, S.L.; Hetnuski, J. & Stewart, B.J. Resin-process methods for improved isolation of organisms from blood and other body fluids. Amer. J. Med., 75 (Suppl. 1B):31-36, 1983.
12. Kaye, D.; Palmieri, M. & Rocha, H. Effect of bile on the action of blood against *Salmonella*. J. Bacteriol. 91:943-952, 1966.
13. Louria, D.B.; Kaminski, T.; Kapila, R.; Tecson, F. & Smith, L. Study on the usefulness of hypertonic culture media. J. Clin. Microbiol., 4: 208-213, 1976.
14. MacLowry, J.D. Clinical microbiology of bacteremia: an overview. Amer. J. Med., 75 (Suppl 1B): 2-6, 1983.
15. Mascart, G.; Bertrand, F. & Marcart, P. Comparative study of subculture, Gram staining and acridine orange staining for early detection of positive blood cultures. J. Clin. Pathol., 36:595-597, 1983.
16. Minkus, R. & Moffet, H.L. Detection of bacteremia in children with sodium polyanethol sulfonate: a prospective study. Appl. Microbiol., 22:805-808, 1971.
17. Murray, P.R. Determination of the optimum incubation period of blood culture broths for the detection of clinically significant septicemia. J. Clin. Microbiol., 21:481-485, 1985.
18. Paisley, J.W.; Todd, J.K. & Roe, M.H. Early detection and preliminary susceptibility testing of positive pediatric blood cultures with the Steers replicator. J. Clin. Microbiol., 6: 367-372, 1977.
19. Pfaller, M.A.; Westfall, L.M.; Niles, A.C.; Kjuroth, A. & Murray, P.R. Comparison of tryptic soy broth with tryptic soy broth supplemented with sucrose in the septicheck blood culture system. J. Clin. Microbiol., 17: 272-275, 1983.
20. Radhi, M.S.G. & Suassuna, I.R. Bacteriemias hospitalares. Folha Med., 91:75-79, 1985.
21. Reimer, L.G. & 22. Reller, L.B. Effect of sodium polyanetholesulfonate and gelatin on the recovery of *Gardnerella vaginalis* from blood culture media. J. Clin. Microbiol., 21:686-688, 1985.
23. Rosett, W. & Hodges, G.R. Antimicrobial activity of heparin. J. Clin. Microbiol., 11:30-34, 1980.
24. Rosner, R. A quantitative evaluation of three blood culture systems. Amer. J. Clin. Pathol., 57:220-227, 1972.
25. Rosner, R. Evaluation of four blood culture systems using parallel culture methods. Appl. Microbiol., 28:245-247, 1974.
26. Rosner, R. Comparison of isotonic and radiometric-hypertonic cultures for the recovery of organisms from cerebrospinal, pleural and synovial fluids. Amer. J.

Clin. Pathol., 63:149-152, 1975. 27. Shanson, D.C. An experimental assessment of different anaerobic blood culture methods. J. Clin. Pathol., 27:273-279, 1974. 28. Silva, H.S. & Washington II, J.A. Optimal time for routine early subculture of blood cultures. J. Clin. Microbiol., 12:445-446, 1980. 29. Staneck, J.L. & Vincent, S. Inhibition of *Neisseria gonorrhoeae* by sodium polyanethole sulfonate. J. Clin. Microbiol., 13:463-467, 1981. 30. Stevens, M. Screening methods for bacteremia. LabMedica 3(2):4-5, 1986. 31. Todd, J.K. Nonculture techniques using blood specimens for the diagnosis of infectious diseases. Amer. J. Med., 75 (Suppl. 1B): 37-43, 1983. 32. Washington II, J.A. (Ed.). The detection of septicemia. CRC Press, Inc., West Palm Beach, Florida, 1978. 33. Washington II, J.A.; Hall, N.M. & Warren, E. Evaluation of blood culture media supplemented with sucrose or with cysteine. J. Clin. Microbiol., 1: 79-81, 1975. 34. Weinberg, E.; Shungu, D.L. & Gadebusch, H.H. Effectiveness of the antimicrobial removal device, BACTEC 16B medium, and thiol broth in neutralizing antibacterial activities of imipenem, norfloxacin, and related agents. J. Clin. Microbiol., 19:207-209, 1984. 35. Weinstein, M.P.; Rellev, L.B.; Mirrett, S.; Wang, W.L. & Alcid, D.V. Controlled evaluation of trypticase soy broth in agar slide and conventional blood culture systems. J. Clin. Microbiol., 21:626-629, 1985. 36. Weinstein, M.P.; Rellev, L.B.; Mirrett, S.; Wang, W.L. & Alcid. Clinical comparison of an agar slide blood culture bottle with tryptic soy broth and a conventional blood culture bottle with supplemented peptone broth. J. Clin. Microbiol., 21:815-818, 1985.

Italo Suassuna
Faculdade Ciências Médicas UERJ
Rua Manuel de Abreu, 48
20550 Rio de Janeiro RJ

Mansfield, J.M. - Parasitic Diseases. The chemotherapy. Marcel Dekker, Inc., vol.2.

O livro intitulado "Parasitic Diseases - vol.2 The Chemotherapy", editado por John M. Mansfield, através de Marcel Dekker, Inc., traz uma excelente revisão sobre o avanço terapêutico alcançado nos últimos anos no tratamento de malária, esquistossomíase, tripanosomiases e leishmaníase. Esse volume contém 233 páginas e é dividido em cinco capítulos: 1) Quimioterapia antimalárica; 2) Quimioterapia de esquistossomíase; 3) Quimioterapia da doença de Chagas; 4) Quimioterapia de tripanosomiase africana; 5) Quimioterapia de leishmaníase.

A Farmacoterapia de cada doença é apresentada de forma sucinta, mas bastante didática e organizada, com descrição dos fármacos de uso convencional, seus principais mecanismos de ação, farmacocinética e aspectos clínicos e toxicológicos. O esquema posológico e o modo de administração dos fármacos são descritos, na sua maioria, individualmente para cada caso. Os autores estabeleceram correlação entre os estudos experimentais e clínicos de fármacos específicos e conduziram as discussões sobretudo em torno das interações entre fármacos e parasitas, sem entrar em detalhes de generalidades ou aspectos básicos de farmacodinâmica, bioquímica ou de biologia parasitária.

A apresentação de fármacos potencialmente ativos contra diferentes agentes, ainda que se encontrem em fase experimental, mostra boas perspectivas futuras no campo da terapêutica antiparasitária.

Todos os capítulos são acompanhados de extensa Referência Bibliográfica que é de utilidade aos estudiosos da área. Ademais, as ilustrações são boas e corretas.

Portanto, a obra é de valor principalmente aos médicos, farmacologistas e biólogos, como fonte de dados, para atualização terapêutica dessas doenças que constituem constante ameaça à saúde da nossa população.

Seizi Oga
Prof. Adjunto de Farmacologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
05508 São Paulo SP

Moraes, F.F. & Zanin, G.M., eds. - Anais do II Seminário de Hidrólise Enzimática de Biomassas - 2 vols., 509p. - 1986. Univ. Est. de Maringá - Pr.

Este seminário realizou-se em Maringá, Pr. de 10 a 13 de dezembro de 1985, sob a coordenação dos editores dos Anais aqui apresentados. Contou com a presença de 130 participantes, sendo a grande maioria profissionais de universidades, institutos de pesquisa e empresas estatais e privadas, ligadas a esta área da Biotecnologia. O simpósio contou com Painel de Abertura sob título "As agências financiadoras e as prioridades na hidrólise enzimática de biomassas"; 5 sessões de conferências versando sobre hidrólise enzimática de biomassas, produção e imobilização de microrganismos e enzimas, fermentação alcoólica e sacarificação de materiais celulósicos; 3 sessões técnicas com apresentação de linhas de pesquisa e sessão de apresentação de trabalhos na forma de "posters". Finalmente os anais apresentam as conclusões dos 4 grupos de trabalho formados durante o evento para discutir rumos e prioridades das pesquisas na área.

O III Seminário foi programado para 07 a 11.12.1987 no mesmo local e abordará assunto como Biopolpação, bagaço de cana como ração, desliquificação, fermentação em fase sólida, biosensores, etc.

Informação com os editores no Deptº Eng. Química da Universidade Estadual de Maringá - Fone (0442) 22-4242 - ramal 323.

Leonardo Perego Junior
Deptº de Tecn. Bioq. Farmacêutica SBT
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
USP

Veterinary Microbiology - An International Journal

Uma análise detelhada do periódico "Veterinary Microbiology" editado pela ELSEVIER, permite verificar que se trata de uma revista de padrão internacional, com excelentes trabalhos publicados nas áreas de Bacteriologia e Virologia. Os assuntos tratados são bastante atuais e a apresentação do periódico não só quanto ao conteúdo mas também quanto a forma são altamente elogáveis.

O corpo editorial é bastante diversificado, contando com a colaboração de renomados pesquisadores de vários países que dominam a tecnologia de ponta no campo da microbiologia veterinária. Alguns já tiveram a oportunidade de visitar o Brasil, mais especificamente a UNICAMP e a UNESP, como é o caso do Dr. C.L. Gyles de Guelph, Ontário Canadá que contribui consideravelmente em nossas pesquisas no campo da colibacilos suina.

Trata-se evidentemente de um periódico indexado com resumos aparecendo em várias revistas de referência.

Concluindo, é um periódico de presença obrigatória nas bibliotecas de instituições e universidades que realizam pesquisas, principalmente na área veterinária e se constitui, a nosso ver, em uma revista compatível com publicações de autores brasileiros, especificamente microbiologistas veterinários.

Prof. Dr. A.F. Pestana de Castro
Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
UNICAMP
Caixa Postal 6109
13081 Campinas SP

Yasuda, P.H.; Strigerwalt, A.G.; Sulzer, K.R.; Kaufmann, A.F.; Rogers, F. & Brenner, D.J. - Deoxyribonucleic Acid Relatedness between Serogroups and Serovars

in the Family Leptospiraceae with Proposals for Seven New *Leptospira* Species - Intern. J. of Sistematic Bacteriology, 37(4):407-415, 1987.

A técnica de hibridização do ácido desoxirribonucleico tem se revelado uma ferramenta de grande utilidade em taxonomia bacteriana. Com efeito, grupos bacterianos que tradicionalmente sempre foram de difícil caracterização e grupos nos quais a classificação se baseava em provas sorológicas, quando submetidos às técnicas de hibridização revelam grandes surpresas. Assim aconteceu com a família Leptospiraceae quando 38 sorotipos pertencentes a 22 sorogrupos da espécie *L. interrogans* e 6 da espécie *L. biflexa* foram estudados por Yasuda & col. através da técnica de hibridização do DNA (método da hidroxapatite, 55 e 70°C) sendo então demonstrado que a primeira espécie comporta, no mínimo, mais 5 espécies novas e a segunda, mais duas novas espécies.

Outrossim a metodologia empregada confirma a validade de duas novas espécies propostas anteriormente, a *Leptospira parva* e a *Leptonema illini*.

Dentre as sete novas espécies propostas pelos autores merece especial destaque a *Leptospira santarosai* em honra a Carlos Almeida Santa Rosa, veterinário e microbiologista brasileiro que foi um dos pioneiros no estudo das leptospiroses humana e animal como problema de saúde pública no Brasil.

A nova espécie *L. santarosai* contém sorotipos dos sorogrupos Shermani, Hebdomadis (subsorogrupo Borincana), Tarassovi (subsorogrupos Atlanta e Bakeri e Navet) e ainda, sorotipos bananal, peru e wawain, pertencentes a novo sorogrupo ainda sem denominação.

O Prof. Santa Rosa trabalhou em nosso Departamento onde exerceu liderança incontestável tanto científica, avalisada por seu vasto saber, quanto humana alicerçada em sua retidão de caráter e em sua transparência como pessoa humana.

Seu precoce desaparecimento deixou entre nós uma lacuna que jamais será preenchida.

Reveste-se pois do maior merecimento a homenagem proposta pelos autores ao designar esta nova espécie como *Leptospira santarosai*.

Paulo H. Yasuda, membro do Deptº de Microbiologia do ICBUSP, discípulo dileto e legítimo continuador da escola de Santa Rosa, tem balisado sua escalada científica e universitária com marcos significativos dentre os quais avulta a pesquisa objeto destes comentários, cuja importância é desnecessário encarecer.

Seu nome passa a ser, doravante, de citação obrigatória para todos os pesquisadores que se ocupem da família Leptospiraceae.

Consignamos nossos cumprimentos ao Dr. Paulo H. Yasuda e colaboradores por tão significativa quanto original contribuição ao estudo da sistemática das leptospiras.

Gil Vital Alvares Pessoa
Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

VOLUME 18 JANEIRO-MARÇO 1987 NÚMERO 1

	CONTEÚDO	CONTENTS
Hofer, E.	1 <i>Vibrio cholerae</i> não 01 associado à infecção entérica humana no Estado da Bahia, Brasil	Non-01 <i>Vibrio cholerae</i> associated with human infection in the State of Bahia, Brazil

Yoshida, C.F.T.; Nogueira, R.M.R.; Mercadante, L.A.C.; Pinhão, A.T.; & Schatzmayr, H.G.	5	Soroepidemiologia das hepatites A e B, citomegalovírus e herpes simplex tipo 2 em doadores de sangue primários do Rio de Janeiro, Brasil	Seroepidemiological survey of hepatitis A and B cytomegalovirus and herpes simplex type 2 in prime blood donors from Rio de Janeiro, Brazil
Montassier, H.J.; Richtzenhain, L.J.; Samara, S.I.; & Pinto, A.A.	12	Aplicação de uma técnica de ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") no diagnóstico direto do vírus da febre aftosa	Application of a solid Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the direct diagnosis of foot and mouth disease virus
Mendes, E.N.; Queiroz, D.M. de M.; Cisalpino, E.O.; Peres, J.N.; Penna, F.J.; & Figueiredo F., P.P.	25	Ocorrência de <i>Campylobacter jejuni</i> em crianças com e sem diarréia, em Belo Horizonte	<i>Campylobacter jejuni</i> isolated from children with acute diarrhoea
Serpantino, A.H.; Santos, M.A.A. dos; Mós, E. do N.; & Ferreira, C.S.	31	Método quantitativo para avaliação da placa dental	Dental plaque evaluation by quantitative method
Assis, J.P. de; Guimarães, W.V.; Borges, A.C.; Araújo, E.F. de; & Silva, D.O.	34	Transferência de plasmídios e de marcas cromossômicas em <i>Zymomonas mobilis</i>	Plasmids and chromosome transfer in <i>Zymomonas mobilis</i>
Nascimento, G.G.F. do; & Tavares, F.C.A.	41	Transformação com genes Nif em <i>Azotobacter paspali</i>	Transformation with nif genes in <i>Azotobacter paspali</i>
Araújo, E.H. de; & Schmidell Netto, W.	46	Energia de desativação de amiloglicosidase em solução de amido	Deactivation energy for glucoamylase on soluble starch
Alterthum, F.; & Cruz, M.R. de M.	52	Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja	Yield increase in alcoholic fermentation by the addition of soybean oil
Braga, V.M.M.; & Nicoli , J.R.	58	Influência da inoculação de esporos ou micélio de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em fermentação em meio sólido de resíduo de capim Napier (<i>Pennisetum purpureum</i> Shumaker)	Influence of spore and mycelium inoculation of <i>Phanerochaete chrysosporium</i> on solid-state fermentation of Napier grass (<i>Pennisetum purpureum</i> Shumaker) residue
Tauk, S.M.; & Ruegger, M.S.	67	Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça, no Município de Corumbataí, SP	Aspects of microflora in soil under "cerrado" vegetation, treated with vinasse in Corumbataí, São Paulo, Brazil

Nahas, E.; & Arai, N.N.S.	77	Crescimento e esporulação de <i>Beauveria bassiana</i> em vários meios e condições de cultivo	Growth and sporulation of <i>Beauveria bassiana</i> in different media and culture conditions
Fonseca Netto, G.S.O. da & Rosato, Y.B.	83	Influência de fatores de nitrogênio no desenvolvimento de duas linhagens de <i>Aspergillus nidulans</i>	Influence of nitrogen source on development of two strains of <i>Aspergillus nidulans</i>
Minhoni, A.T. de A.; & Cerri, C.C.	87	Aplicação da radiação gama na determinação da biomassa microbiana de um solo incorporado com vinhaça	Gamma radiation application for microbial biomass determination in a soil incorporated with distillery wastewater
Landgraf, M; & Falcão, D.P.	93	Isolamento de <i>Versinia</i> sp. em alimentos diversos	Isolation of <i>Versinia</i> spp. from foods
Franco, B.D.G. de M.; Landgraf, M.; Shimokomaki, M.; & Azevedo, C.H.M. de	98	Condições higiênico-sanitárias do charque comercializado em São Paulo, Brasil	Hygienic quality of charqui
Panno, L.C.; Ojeda A., S.; & Pinto, V.O.	103	Aislamiento e identificación de enterobacterias en lechugas (<i>Lactuca sativa</i>) cultivadas en la ciudad de Valdivia, Chile	Isolation and identification of enteric bacteria from lettuce (<i>Lactuca sativa</i>) cultivated in the town of Valdivia, Chile

Informação
Técnico-Científica SEM 109

VOLUME 18 ABRIL-JUNHO 1987 NÚMERO 2

		CONTEÚDO	CONTENTS
Uzeda, M. de; Ferreira, M.C. de S.; Filippis, I. de; & Bellintani, E.M.	117	Concentrações inibitórias mínimas de ciprofloxacin (BAV-9867) para bactérias isoladas no Rio de Janeiro, RJ	Minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin (BAV-9867) for bacteria isolated in Rio de Janeiro
Velazco, C.; Filippis, I. de; Uzeda, M. de; & Benchetrit, L.C.	122	Sensibilidade de estafilococos coagulase negativos a ciprofloxacin in vitro	Susceptibility of coagulase negative staphylococci to ciprofloxacin in vitro
Almeida, A.M.P. de; Leal, N.C.; Brasil, D.P.; & Almeida, C.R. de	126	Estudo comparativo entre as técnicas de hemaglutinação e aglutinação bacteriana no diagnóstico da peste humana	Comparison of passive hemagglutination and bacterial agglutination tests for serodiagnosis of plague

Tamayo, R.; Schoebitz, R.; & Boldt, F.	131	Evidencia serológica de lengua azul (Bluetongue) en ovinos de la Décima Región de Chile	Serologic evidence of bluetongue virus in sheep of the Tenth Region, Chile
Freitas, A.C. de; Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D.	136	Comparação entre as técnicas de filtração e centrifugação no isolamento de <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> a partir de água	Comparison filtration and centrifugation techniques for isolation of <i>Yersinia</i> <i>enterocolitica</i> from water
Furlanetto, S.M.P.; Nader Fº, A.; Wilson, D.; & Schocken-Iturrino, R.P.	138	<i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigenicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas	Enterotoxigenic <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from milk of mastitic cows
Noletto, A.L.S.; & Tibana, A.	144	Surto de intoxicação alimentar por enterotoxina estafilocócica B	Outbreak staphylococcal enterotoxin B food poisoning
Colen, G.; Niccoli, J.R.; & Vieira, E.C.	146	Seleção de microrganismos coagulantes do leite	Screening milk-clotting microorganisms
Baralle, S.B.; & Borzani, W.	151	Utilização preferencial da glicose na fermentação descontínua de soro de leite por <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Preferential utilization of glucose during batch fermentation of whey by <i>Lactobacillus bulgaricus</i>
Ferreira, S.V.; Silva, I.M. da; & Martelli, H.L.	156	Quantificação da coenzima F420 em lodo anaeróbio proveniente da biodigestão de vinhoto de cana	Quantification of the coenzyme F420 in anaerobic sludges from sugar cane stillage biodegradation
Linardi, V.R.; & Park, Y.K.	159	Melhoramento de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> por DNA transformante e fusão de protoplastos, para produção de amilase e proteases	Improvement of <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> by DNA mediated transformation and protoplast fusion for amylase and proteases production
Eira, A.F. da; Minhoni, M.T. de A.; Salles Fº, S.L.M.	166	Aparelho simplificado para determinação de carbono por combustão seca	Simplified apparatus to quantitative organic carbon determinations by dry combustion
Santos, M.A.A. dos; & Mós, E. do N.	169	Modificação da técnica "roll-tube" com meios de cultura pré-reduzidos para isolamento de microrganismos anaeróbios estritos	

Campos, E.P. de; Brasil, O.G.; & Campos, C.E.O.P. de	171	Redução da absorção de oxigênio por <i>Klebsiella</i> spp. sob ação de antimicrobianos	Oxygen uptake in Clark's polarography of <i>Klebsiella</i> spp. isolated from pulmonary infections
Jungmann, D.M.; & Ferreira, L.C. de S.	178	Cura de plasmídeos de <i>Escherichia coli</i> e <i>Salmonella typhimurium</i> pelo tratamento com sódio dodecil sulfato e incubação em temperatura elevada	Plasmid curing of <i>Escherichia coli</i> and <i>Salmonella typhimurium</i> by treatment with sodium dodecyl sulfate and high temperature incubation
Prieto, G.; Vargas, J.; & Martínez, A.	184	Caracterización genética y molecular de plásmidos que median multirresistencia en <i>Shigella</i>	Genetic and molecular characterization of plasmids that mediate multiresistance in <i>Shigella</i>

Informação
Técnico-Científica SBM 193

VOLUME 18 JULHO-SETEMBRO 1987 NÚMERO 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	Detection of rotavirus by ELISA in diarrhoeal faeces of neonatal calves
Durigon, E.L.; Ángelo, 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), imunoelétroforese (IEOF) e imunomicroscopia eletrônica (IME), para o diagnóstico etiológico da parvovirose canina	Comparison of hemagglutination test, isolation in tissue culture, immunoelctroosmosophoresis and immunoelectronmicroscopy for diagnosis of canine parvovirus infection
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	Effect of the lymphoid leukosis virus and infectious bursal disease virus over the vaccination against Newcastle disease virus
Magalhães, M.	219	Resistência cromossômica à penicilina em <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Chromosomal resistance to penicillin in <i>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</i> and <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolated from stomatitis in <i>Bothrops alternatus</i> (Serpente, Viperidae)

Magalhães, M.	229	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> produtora de penicilinase no Recife, Brasil	Penicillinase producing <i>Neisseria gonorrhoeae</i> in Recife, Brazil
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	Occurrence of <i>Versinia</i> sp. in natural aquatic resources of Rio de Janeiro city
Pavan, M. de F.B.; Mamizuka, E.M.; Martinez, M.B.	243	<i>Campylobacter</i> termofílico em fezes de crianças com diarréia: estudo com controles	Thermophilic <i>Campylobacter</i> in stools of children with diarrhea: study with controls
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 albicans</i>	Evaluation of a fluorescent method in the study of the viability of <i>Candida 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.; & Kermelmeir, C.	276	Ocorrência da galactose oxidase em <i>Fusarium graminearum</i>	Galactose oxidase occurrence in <i>Fusarium 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 SRM	292		

	CONTEÚDO	CONTENTS
Silva, T.C.P.G. da; Gallo, M.E.N.; Almeida, S.M.R. de; & Palmeira, E.N.	301 Índices bacteriológico e morfológico no auxílio ao diagnóstico e tratamento dos pacientes hansenianos*	Bacteriologic and morphologic index for diagnosis during the treatment in leprosy patients
Guerreiro, H.M.N.; Hagge, S.; Conceição Fº, J.L.; & Barbosa, H.S.	305 Vaginite por <i>Gardnerella vaginalis</i> - prevalência e avaliação de metodologia para seu diagnóstico	<i>Gardnerella vaginalis</i> vaginitis - prevalence and methodology evaluation for it's diagnosis
Freitas, A.C. de; Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D.	311 Sobrevivência de <i>Yersinia enterocolitica</i> em diversos sistemas aquáticos experimentais	Survival of <i>Yersinia enterocolitica</i> in different experimental aquatic systems
Valentini, S.R.; Leite, C.Q.F.; Giannini, M.J.S.M.; & Falcão, D.P.	318 Indicadores de contaminação fecal e enteropatógenos em águas de recreação	Indicators microorganisms and enteropathogens in recreational waters
Falcão, D.P.; & Shimizu, M.T.	324 Avaliação de técnicas de isolamento de <i>Yersinia enterocolitica</i> a partir de fezes de camundongos infectados experimentalmente	Evaluation of techniques and culture media for isolation of <i>Yersinia enterocolitica</i> from mice's stools experimentaly infected
Rabinovitch, L.; & Vasconcellos, F.J.M. de;	330 Um novo meio para detecção e contagem de <i>Bacillus cereus</i> em alimento	A new medium for the detection and enumeration of <i>Bacillus cereus</i> in food
Gomes, M. de F.F.F.; & Furlanetto, S.M.P.	335 Grupos de bactérias isoladas a partir de amostras de fígado de bovino	Bacterial groups isolated from beef liver
Nascimento, G.G.F. do; & Tavares, F.C.A.	344 Ocorrência de plasmídios em linhagens bacterianas fixadoras assimbióticas de nitrogênio	Detection of bacteria plasmids in non-symbiotic fixer strain
Fava, S.D.C.; Netto, C.F.; Costa, E.O.; & Cuoe, L.C.	349 Distribuição geográfica e morbidade da paracoccidioidomicose no Estado de São Paulo	Geographical distribution and morbidity rate of paracoccidioidomycosis in São Paulo State Brazil
Mezzari, A.; Cauduro, P.F.; & Dias, C.A.G.	357 Relato de um caso de dermatofitose pelo <i>Trichophyton tonsurans</i> no Rio Grande do Sul	<i>Trichophyton tonsurans</i> : description of a case seen in the State of Rio Grande do Sul, Brazil

Giesbrecht, A.M.; Barbosa, R. de C.S.B.C.; & Paula, C.R.	360	Atividade antifúngica in vitro de algumas amidas naturais e seus precursores	Antifungic activity of natural amides
Gambale, W.; Paula, C.R.; Correa, B.; Purchio, A.; & Martins, M.T.	363	Avaliação da microbiota fúngica em lodo digerido submetido a tratamento químico e térmico	Valuation of molds and yeasts in raw sludge after thermic and chemical treatment
Paula, C.R.; Costa, E.O.; Pires, M. de F.C.; Coutinho, S.D.A.; Carvalho, V.M.; Castilho, W.; & Moral, M.S.	366	<i>Scopulariopsis</i> <i>brevicaulis</i> : agente etiológico de dermatose em cães e equinos	<i>Scopulariopsis</i> <i>brevicaulis</i> : etiologic agent of dermatosis in dogs and horses
Jerez, J.A.; Candeias, J.A.N.; Durigon, E.L.; Rácz, M.L.; & Ribeiro, L.C.	371	Anticorpos anti-rotavírus em bovinos	Antibodies against rotavirus in calves
Couceiro, J.N. dos S.S.; Couceiro, E. dos S.S.; & Machado, R.D.	375	Circulação simultânea de myxovírus e paramyxovírus numa comunidade aviária ornamental	The simultaneous circulation of myxovirus and paramyxovirus in a ornamental bird community
Salles Fº, S.L.M.; & Eira, A.F.	380	Biogênese do metano em condições de elevada acidez e alcalinidade nula: I. Perspectivas de um novo conceito operacional para tratamento anaeróbio de efluentes industriais	Methane biogenesis at low pH and null alkalinity conditions: I. Perspectives of a new operational concept in the anaerobic treatment of industrial wastewaters
Informação Técnico-Científica SBM	391		