

# Revista de Microbiologia



**SBM**

Sociedade  
Brasileira de  
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 19 Número 1 Jan.-Mar. 1988

## Instruções aos autores

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

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

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

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual Biological Journals" (2.ª edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nanômetro (n) e pico (p), ao invés de milímicro ( $m\mu$ ) micromicro ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro ( $\mu m$ ;  $10^{-6} m$ ), ao invés de micro ( $\mu$ ); nanômetro ( $nm$ ;  $10^{-9} m$ ), ao invés de milímicro ( $m\mu$ ); e Angstroms ( $\text{Å}$ ;  $10^{-10} m$ ). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ( $\mu g/ml$ ) ou microlitros por litro ( $\mu l/litro$ ). A Revisão se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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



REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cid. Universitária - USP

05508-900 - São Paulo/SP

## Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

São Paulo — Brasil

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

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

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

**Aquisição por não-membros** Assinatura anual para quatro números 5 OTN's para o Brasil: US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) para o Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

**Acquisition by non-members** Annual subscription: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

**Impressão** Gráfica Editora Hamburg Ltda.

## Sociedade Brasileira de Microbiologia

|                  |  |  |
|------------------|--|--|
| <b>Diretoria</b> | Presidente<br>Milton de Uzedo<br>Instituto de Microbiologia UFRJ<br>Centro de Ciências da Saúde<br>Bloco I — Ilha do Fundão<br>21941 Rio de Janeiro RJ | Vice-Presidente<br>Flavio Alterthum<br>Instituto de Ciências Biomédicas USP<br>Deptº de Microbiologia<br>Av. Prof. Lineu Prestes, 1374<br>05508 São Paulo SP |
|                  | Secretário Geral<br>Leonardo Perego Jr.<br>Faculdade de Ciências<br>Farmacêuticas USP<br>Cidade Universitária<br>05508 São Paulo SP                    | Tesoureiro<br>Walderez Gambale<br>Instituto de Ciências Biomédicas USP<br>Deptº de Microbiologia<br>Av. Prof. Lineu Prestes, 1374<br>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  
Depto. de Microbiologia - ICB II - USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Cid. Universitária  
CEP 05508-900 - São Paulo - SP - BRASIL  
Site: [www.revmicro.cjb.net](http://www.revmicro.cjb.net)

**REVISTA DE MICROBIOLOGIA**  
**PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA**  
**VOLUME 19 JANEIRO-MARÇO 1988 NÚMERO 1**  
**REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 19(1)**

**CONTEÚDO**

Modolo, J.R.;  
 Bisping, W.;  
 & Kirpal, K.

Mendes, E.N.;  
 Queiroz, D.M. de M.;  
 & Cisalpino, E.O.

Saridakis, H.O.;  
 Ferreira, A.J.P.;  
 Pelayo, J.S.;  
 & Falcão, D.P.

Hipólito, M.;  
 Bersano, J.G.;  
 Moulin, A.A.P.;  
 Calil, E.M.B.;  
 & Baldassi, L.

Pelayo, J.S.;  
 & Saridakis, H.O.

Campos, C.E.O.P. de;  
 Filho, E.P. de C.;  
 & Campos, E.P. de

Franco, B.D.G. de M.;  
 & Nielsen, E.M.F.

- 1 Características  
 bioquímicas de  
*Campylobacter* isolados  
 de bezerros com e sem  
 diarréia\*

- 6 Valor do exame de  
 esfregaço de fezes  
 corado pelo método de  
 Gram modificado no  
 diagnóstico da enterite  
 causada pelo  
*Campylobacter jejuni*

- 12 Isolamento de *Yersinia*  
*pseudotuberculosis* de  
 bezerros, na região de  
 Londrina, Paraná, Brasil

- 14 *Pseudomonas aeruginosa*  
 como agente de  
 encefalite em suínos

- 17 Sorotipos de *Salmonella*  
 isolados de produtos  
 cárneos em Londrina -  
 Paraná

- 22 Estudo comparativo de  
 duas novas  
 cefalosporinas com  
 outras drogas  
 antimicrobianas frente a  
 bastonetes Gram  
 negativos

- 27 Avaliação de um teste  
 rápido de aglutinação em  
 lâminas para  
 identificação de  
 culturas de  
*Staphylococcus aureus*  
 isoladas de alimentos

**CONTENTS**

Biochemical characters  
 of *Campylobacter* sp,  
 isolated from calves  
 with and without  
 diarrhea

The value of a modified  
 Gram staining of feces  
 smears for diagnosis of  
*Campylobacter jejuni*  
 enteritis.

Isolation of *Yersinia*  
*pseudotuberculosis* from  
 calves, in Londrina,  
 Paraná, Brazil

*Pseudomonas aeruginosa*  
 as agent of swine  
 encephalitis

Serotypes of *Salmonella*  
 isolated from meat  
 products in Londrina -  
 Paraná

Comparative studies of  
 two cephalosporins with  
 other antimicrobial  
 drugs against Gram  
 negative rods

Evaluation of a rapid  
 slide agglutination test  
 for the identification  
 of *Staphylococcus aureus*  
 isolated from foods

|   |    |  |  |
|---|----|--|--|
| Martins, M.T.;<br>Pessoa, G.V.A.;<br>Sanchez, P.S.;<br>Sato, M.I.Z.;<br>Monteiro, C.K.;<br>Coimbrão, C.A.;<br>Marques, E.;<br>& Irino, K. | 29 | Isolamento de <i>Salmonella</i> no ambiente aquático: significado sanitário  | <i>Isolation of Salmonella from aquatic environment: Sanitary significance</i>   |
| Júnior, J.P. de S.;<br>Lemos, M.V.F.;<br>& Azevedo, J.L. de   | 40 | Eliminação de um plasmídio de <i>Staphylococcus aureus</i> pela 8-metoxipsoralein associada à luz UV longa   | <i>Elimination of a <i>Staphylococcus aureus</i> plasmid by 8-methoxysoralen plus near UV light*</i>   |
| Lang, D.;<br>Siqueira, L.F. de G.;<br>Belda, W.;<br>Júnior, M.F.Q. dos S.;<br>Silveira, M.C.;<br>& Francisco, W.                          | 42 | Go-slideR como meio de transporte. Avaliação técnica   | <i>Go-slide as a transport medium. Technical evaluation</i>  |
| Timenetsky, J.;<br>& Alterthum, F.  | 46 | Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes domésticos   | <i>Determination of antimicrobial activity of domestic disinfectants</i>   |
| Kilikian, B.V.;<br>Kahvedjian, M.;<br>& Netto, W.S.   | 52 | Influência do cálcio na estabilidade de $\alpha$ -amilase bacteriana   | <i>Influence of calcium on the thermal stability of bacterial <math>\alpha</math>-amylase</i>  |
| Avila-Campos, M.J.;<br>Souza, E.C. de;<br>Farias, L. de M.;<br>Carvalho, M.A.R. de;<br>Damasceno, C.A.V.;<br>& Cisalpino, E.O.            | 56 | Adequação metodológica para testes de susceptibilidade de <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> a drogas antimicrobianas   | <i>Methodological adequacy for susceptibility test of <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> to antimicrobial drugs*</i>  |
| Scotti, M.R.;<br>Sá, N.M.H. de;<br>Vargas, M.A.T.;<br>& Dobereiner, J.  | 60 | Avaliação da resistência à tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol de estípites de <i>Bradyrhizodium japonicum</i> e <i>Bradyrhizodium</i> de <i>Stylosanthes</i> isoladas de solo de cerrados | <i>Evaluation for tetracycline, kanamycin and chloranphenicol resistance of <i>Bradyrhizodium japonicum</i> and <i>Bradyrhizodium</i> of <i>Stylosanthes</i> isolated from cerrado soils</i> |
| Costa, J.L. da S.;<br>Kushalappa, A.C.;<br>& Alfenas, A.C.  | 67 | Efeito de extratos proteicos de milho sobre a produção de aflatoxina B   | <i>Effect of corn protein extracts on aflatoxin B production</i>   |
| Schmidell, W.;<br>Facciotti, M.C.R.;<br>Kilikian, B.V.;<br>Abouboul, H.;<br>& Aguero, J.M.Z.  | 71 | Influência da oscilação do pH na síntese de amiloglicosidase por <i>Aspergillus awamori</i>  | <i>Influence of pH oscillations in amylglucosidase production by <i>Aspergillus awamori</i></i>  |

Neirotti, E.;  
& Azevedo, J.L.

78 Técnica semiquantitativa  
de avaliação da produção  
de celulases em *Humicola*  
*sp*

Semiquantitative method  
to evaluate celulases  
production in *Humicola*  
*sp*

Higuchi, T.;  
Ogata, H.;  
Veiga, S.S.;  
Nogueira, Z.M.;  
& Felippe, J.M.M. de S.

82 Purificação da  
imunoglobulina (IgG) de  
coelho, obtenção de soro  
de carneirão Anti-IgG de  
coelho e aplicação em  
radioimunoensaio de p15  
do vírus da leucose de  
aves.

Purification of rabbit  
IgG, obtention of sheep  
antirabbit IgG and their  
use in radioimmunoassay  
of avian leukosis  
virus-p15

Informação  
Técnico-Científica SBM

89

## PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

MCT  CNPq  finep



## CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE CAMPYLOBACTER ISOLADOS DE BEZERROS COM E SEM DIARRÉIA\*

José Rafael Modolo

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu UNESP  
Caixa Postal 524  
18610 Rubião Junior SP, Brasil

W. Bisping  
& K. Kirpal

Instituto de Microbiologia e Epidemias Veterinárias de Hannover  
R.F.A.  
Bischofsholer Dann 15 - 3000 Hannover - 1 R.F.A.

### Resumo

Sessenta amostras de *Campylobacter* sp, isoladas de bezerros com e sem diarréia foram testadas frente a 11 testes bioquímicos. Dentro dos critérios propostos, *Campylobacter* sp, foi classificado, 53,3% como *Campylobacter jejuni* (biotipo 1 e biotipo 2); 8,4% como *Campylobacter coli*; 20% como *Campylobacter jejuni/coli*; 15% como NARTC - grupo e 3,3% como *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*. Foram englobadas algumas novas cepas de *Campylobacter* sp, com determinadas características fenotípicas, obedecendo a nomenclatura aceita pela "Approved List of Bacterial Names" (1980).

### Summary

*Biochemical characters of Campylobacter sp, isolated from calves with and without diarrhea*

Sixty samples of *Campylobacter* sp, isolated from calves with and without diarrhea were tested biochemically and classified as follows: 53,3% *Campylobacter jejuni* (biotype 1 and biotype 2), 8,4% *Campylobacter coli*, 20% *Campylobacter jejuni/coli*, 15% NARTC - group, 3,3% *Campylobacter fetus* subsp *venerealis*. Enclosed some new strains of *Campylobacter* sp, with certain phenotypic characters according to the nomenclature referred by the Approved List of Bacterial Names (1980).

### Introdução

Sebald & Véron (13) propuseram pela primeira vez o gênero "*Campylobacter*" como um grupo diferente e à parte do gênero "*Vibrio*", tendo em vista que características existentes entre esses dois microrganismos não justificam uma classificação comum.

Na atualidade são utilizadas duas sistemáticas de nomenclatura: uma segundo Smibert (17) e outra segundo Véron & Chatelain (20), que é a aceita pela "Approved List of Bacterial Names" (14).

\*Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia e Epidemias Veterinárias da Escola Sup. de Med. Vet. de Hannover, com recursos do "Deutscher Akademischer Austauschdienst/DAAD.R.F.A. 1982 a 1985.

Skirrow & Benjamin (15, 16) propuseram um novo grupo conhecido como NARTC - "Nalidixin Acid Resistant Thermophile *Campylobacter*".

O objetivo deste trabalho é tentar classificar bioquimicamente *Campylobacter* sp, isolados de bezerros com e sem diarréia, uma vez que Modolo & col. (no prelo) apontam este microrganismo como um agente patogênico oportunista e causador de diarréia ou enterite em bezerros e Behrens & col. (1) como causador de uma das mais importantes zoonoses.

Neste trabalho utilizamos basicamente a sistemática aceita pela "Approved Lists", através da qual foram englobadas algumas novas cepas de *Campylobacter* sp, com determinadas características fenotípicas.

## Material e Métodos

As 60 amostras de *Campylobacter* sp, originaram-se do reto, íleo e colo de bezerros com e sem diarréia. Para seu isolamento foram utilizadas técnicas de filtração, semeadura em meio seletivo de Butzler (Oxoid SR85), incubação em diferentes temperaturas e uso de atmosfera especial de crescimento, usadas por Modolo & col. (no prelo) e foram testadas frente as seguintes provas bioquímicas: a. prova de catalase em meio líquido (extrato de carne, peptona, NaCl e 0,08% de agar) a 1:1 com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 3% (20); b. crescimento em meio líquido (extrato de carne, peptona, NaCl e 0,08% de agar) a 25°C e a 43°C por 72 horas em atmosfera ambiente (20); c. crescimento em meio líquido (tioglicolato) com 3,5% de NaCl a 37°C por 72 horas em atmosfera ambiente (18); d. produção de H<sub>2</sub>S em papel de acetato de chumbo, em meio líquido (extrato de carne, peptona, NaCl e 0,08% de agar) com 0,02% de cisteína, a 37°C por 72 horas em atmosfera contendo 1800ml de H<sub>2</sub> e 350ml de CO<sub>2</sub> (teste sensível) (18, 20); e. produção de H<sub>2</sub>S em papel de acetato de chumbo em meio líquido (extrato de carne, peptona, NaCl e 0,08% de agar) sem cisteína, a 37°C por 72 horas em atmosfera ambiente e em meio de Kligler, com atmosfera de 1800ml de H<sub>2</sub> e 350ml de CO<sub>2</sub> (testes insensíveis) (20, 21); f. redução do selenito de sódio a 0,1% em meio líquido (extrato de carne, peptona, NaCl e 0,08% de agar) a 37°C por 72 horas, em atmosfera com 1800ml de H<sub>2</sub> e 350ml de CO<sub>2</sub> (18, 20); g. hidrólise do hipurato de sódio a 1%, sendo adicionado 3,5% de ninhidrina em 1:1 de acetona e n-butanol (6); h. resistência ao ácido nalidíxico (NA a 0,004%), em meio de ágar sangue, a 37°C por 72 horas, em atmosfera de 1800ml de H<sub>2</sub> e 350ml de CO<sub>2</sub> (20); i. tolerância ao 2'3'5' cloreto de trifenil tetrazólio (TTC), a 0,1% em meio de ágar sangue, a 37°C por 72 horas, em atmosfera de 1800ml de H<sub>2</sub> e 350ml de CO<sub>2</sub> (20); j. tolerância a glicina, em meio líquido (tioglicolato), a 0,8%; 1%; 1,2% e 1,6% a 37°C por 72 horas, em atmosfera ambiente (11, 17, 19).

## Resultados e Discussão

As 60 amostras de *Campylobacter* sp, isoladas de conteúdo intestinal de bezerros com e sem diarréia ou enterite puderam, dentro dos critérios propostos, serem subdivididas em 19 Biotipos conforme a Tabela 1.

A primeira subdivisão com 32 (53,3%) cepas agrupadas do biotipo I a V foram classificados como *Campylobacter jejuni*.

Os biotipos I e II, com 17 e 12 cepas respectivamente, mostraram um comportamento bioquímico típico de *Campylobacter jejuni*, ou seja: cresceram a 43°C e não a 25°C, não foram resistentes contra o NA, não toleraram o TTC, reduziram o selenito de Na, produziram H<sub>2</sub>S e hidrolizaram o hipurato (6, 8, 15, 16, 19). Pela diferença da intensidade de produção de H<sub>2</sub>S, essas cepas puderam ser subdivididas em biotipo 1 e biotipo 2 (15, 16).

O biotipo III com 1 (uma) cepa, apesar de não hidrolizar o hipurato, foi classificado com o *Campylobacter jejuni*, pois mostrou, nas demais provas, um comportamento bioquímico típico do *Campylobacter jejuni*.

Harvey & Greenwood (7) também encontraram raras cepas de *Campylobacter jejuni* que não hidrolizaram o hipurato e que com o estudo dos seus DNA essas cepas foram confirmadas como *Campylobacter jejuni*.

Tabela 1 - Resultado bioquímico de 60 cepas de *Campylobacter* sp.

Símbolos: ( )\* nº de amostras

| Bio-<br>tipo | Crescimento |      |      |          | Produção<br>de H <sub>2</sub> S | Redução<br>do Selen.Na | Hidrol.<br>do Hipurato | Resist.Toler. |        | Tolerância a |      |       |      | Nº de<br>Cepas | Resultados                                 |
|--------------|-------------|------|------|----------|---------------------------------|------------------------|------------------------|---------------|--------|--------------|------|-------|------|----------------|--|
|              | Cat.        | 25°C | 43°C | 3,5%NaCl |                                 |                        |                        | ao NA.        | ao TTC | 0,8%         | 1,0% | 1,2%  | 1,6% |                |  |
| I            | +           | -    | +    | -        | -                               | +                      | +                      | +             | +      | +(1)         | +(3) | +(2)* | -    | 17             | <i>C. jejuni</i> biot.1                    |
| II           | +           | -    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | +             | -      | +(3)         | +(3) | -     | -    | 12             | <i>C. jejuni</i> biot.2                    |
| III          | +           | -    | +    | -        | -                               | +                      | +                      | -             | -      | -            | -    | +(1)  | -    | 1              | <i>C. jejuni</i> biot.1                    |
| IV           | +           | +    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | -             | -      | -            | +(1) | -     | -    | 1              | <i>C. jejuni</i> biot.2                    |
| V            | +           | +    | +    | -        | -                               | +                      | +                      | +             | -      | -            | -    | -     | -    | 1              | <i>C. jejuni</i> biot.1                    |
| VI           | +           | -    | +    | -        | -                               | +                      | +                      | -             | -      | +            | -    | -     | -    | 3              | <i>C. coli</i>                             |
| VII          | +           | -    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | -             | -      | +            | -    | -     | -    | 2              | <i>C. coli</i>                             |
| VIII         | +           | -    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | -             | +      | +(1)         | -    | -     | -    | 8              | <i>C. jejuni/coli</i>                      |
| IX           | +           | -    | +    | -        | -                               | +                      | +                      | -             | +      | +(1)         | -    | -     | -    | 2              | <i>C. jejuni/coli</i>                      |
| X            | +           | +    | +    | -        | -                               | +                      | +                      | -             | +      | -            | -    | -     | -    | 1              | <i>C. jejuni/coli</i>                      |
| XI           | +           | +    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | -             | +      | -            | -    | -     | -    | 1              | <i>C. jejuni/coli</i>                      |
| XII          | +           | -    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | +             | +      | -(1)         | -    | -     | -    | 3              | NARTC-grupo                                |
| XIII         | +           | -    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | +             | +      | -            | -    | -     | -    | 1              | NARTC-grupo                                |
| XIV          | +           | -    | +    | -        | -                               | -                      | +                      | +             | -      | +(1)         | -    | -     | -    | 1              | NARTC-grupo                                |
| XV           | +           | -    | +    | -        | -                               | +                      | +                      | -             | +      | -            | -    | -     | -    | 1              | NARTC-grupo                                |
| XVI          | +           | +    | +    | -        | +                               | +                      | +                      | +             | +      | -            | -(1) | -     | -    | 1              | NARTC-grupo                                |
| XVII         | +           | +    | +    | -        | -                               | -                      | *                      | +             | +      | -            | -(1) | -     | -    | 1              | NARTC-grupo                                |
| XVIII        | +           | +    | +    | -        | -                               | -                      | +                      | +             | -      | -(1)         | -    | -     | -    | 2              | <i>C. fetus</i> subsp<br><i>venerealis</i> |
| XIX          | +           | +    | -    | -        | -                               | -                      | -                      | -             | -      | -            | -    | -     | -    | -              |  |

Os biotipos IV e V, com 2 (duas) cepas mostraram também crescimento a 25°C, os quais somente nesses critérios divergiram do espectro de classificação do *Campylobacter jejuni*. Apesar deste comportamento com relação a temperatura foram classificados como *Campylobacter jejuni* biotipo 1 e biotipo 2.

Os biotipos VI e VII com 5 (8,4%) cepas que se diferenciaram somente na intensidade de produção do H<sub>2</sub>S, mostraram um comportamento bioquímico típico do *Campylobacter coli*. As principais e decisivas diferenças com *Campylobacter jejuni* foram que não hidrolizaram o hipurato e toleraram o TTC (6, 8, 15, 16, 19).

Os biotipos VIII até XI, com 12 (20%) cepas, hidrolizaram o hipurato como também toleraram o TTC, as quais respectivamente são reações típicas do *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Estes foram agrupados como *Campylobacter jejuni/coli* pois uma nítida separação entre eles não foi possível. Também outros autores observaram reações comuns entre *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* como Bradbury & col. (5) que demonstraram a existência de plasmídeo comum entre *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*. Harvey & Grenwood (7) verificaram reação cruzada entre imune-soro de *Campylobacter coli*, cujo genótipo era conhecido, com uma cepa de *Campylobacter jejuni*. Possivelmente dentro da nossa análise bioquímica, os *Campylobacter coli* (tolerantes ao TTC) que hidrolizaram também o hipurato merecem novos estudos com a finalidade de incluí-los num possível biotipo do *Campylobacter jejuni*.

Dentro do grupo *Campylobacter jejuni* e outros até o biotipo XI, a prova de tolerância à diferentes concentrações de glicina mostrou grande diversidade de comportamento, não sendo um critério de diferenciação que deva ser usado na classificação.

Os biotipos XII até XVIII, com 9 (15%) cepas, que apresentaram a característica de serem resistentes ao NA e crescimento a 43°C, formaram o grupo conhecido como NARTC e ao lado de todas as outras cepas isoladas foram positivas na prova de catalase e não toleraram os 3,5% de NaCl.

Em alguns exames bioquímicos, as cepas NARTC mostraram nítidas reações cruzadas com *Campylobacter jejuni* (biotipos XIV e XVIII) e com *Campylobacter coli* (biotipo XV). As demais cepas pertencentes ao NARTC-grupo, mostraram uma certa coincidência bioquímica entre as duas espécies.

Segundo Leaper & Owen (8) existem entre o NARTC-grupo o *Campylobacter coli* e o *Campylobacter jejuni*, tanto características genotípicas como também composição de

ácido graxo comum na parede celular. Benjamin & col. (3) noticiaram que há uma coincidência entre os NARTC-grupo com *Campylobacter fetus* sp *fetus* e concluíram que o NARTC-grupo é uma espécie intermediária dentro do gênero *Campylobacter*. Semelhantes observações fizeram também Owen & Leaper (12).

Harvey & Greenwood (7) apesar de não conhecerem as evidências acima separaram o NARTC-grupo de todos os outros *Campylobacter* sp. catalase positiva, através das características fenotípicas e genotípicas, o que confirma ser um grupo a parte.

Nossos resultados referentes às temperaturas de crescimento para *Campylobacter jejuni*, *jejuni/coli* e NARTC-grupo indicam crescimento de estirpes à temperatura de 43°C e também a 25°C.

O biotipo XIX, representado por 2 (duas) (3,3%) amostras mostrou como característica o crescimento a 25°C e não a 43°C, não produziu H<sub>2</sub>S, não reduziu o selenito de Na e não cresceu em meio com glicina. Estas cepas puderam ser classificadas como *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* (4, 17).

O encontro de *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* nas fezes tem uma grande importância epidemiológica, pois Mc Fadyen & Stockman (10) descreveram pela primeira vez o sintoma clínico da Campilobacteriose (Vibriose) genital bovina como enfermidade de transmissão venérea (18).

Alguns autores mostraram, através de análises genotípicas de *Campylobacter* sp., a possibilidade de haver uma pequena relação entre as subespécies do gênero *Campylobacter*. Belland & Trust (2) com auxílio da hibridização do DNA de *Campylobacter*, mostraram uma pequena coincidência na sequência de aminoácidos do *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter fetus*. Logan & Trust (9) noticiaram haver抗ígenos comuns entre *Campylobacter fetus* e *Campylobacter* sp. termofílicos.

Como os comportamentos bioquímicos mostraram e através de critérios propostos, foi possível classificar as cepas de *Campylobacter* sp. dentro do gênero *Campylobacter*, apesar de alguns biotipos apresentarem comportamentos fenotípicos intermediários.

A metodologia utilizada é portanto útil no uso rotineiro laboratorial de classificação desse microrganismo.

## Referências Bibliográficas

1. Behrens, R.; Kist, M. & Helwig, H. - *Campylobacterinfektion bei Kindern*. Immun. Infekt., 11:55-60, 1983.
2. Belland, R.J. & Trust, T.J. - Deoxyribonucleic acid sequence relatedness between thermophilic members of the genus *Campylobacter*. J. gen. Microbiol., 128:2515-2522, 1982.
3. Benjamin, J.; Leaper, S.; Owen, R.J. & Skirrow, M.B. - Description of laridis, a new species comprising the nalidixic acid resistant thermophilic *Campylobacter* (NARTC) group. Curr. Microbiol., 8:231-238, 1983.
4. Bisping, W. - Zur bakteriologischen Diagnose der Vibrio fetus: - Infektion bei Bullen. Berl. Munch tierarztl. Wschr., 76:456-461, 1974.
5. Bradbury, C.B.; Murray, M.A.; Hennessy, J.N. & Penner, J.L. - Occurrence of plasmid DNA in serologically defined strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Infect. Immun., 40:460-463, 1983.
6. Harvey, S.M. - Hippurate hydrolysis by *Campylobacter fetus*. J. Clin. Microbiol., 11:435-437, 1980.
7. Harvey, S.M. & Greenwood, J.R. - Relationship among catalase positive *Campylobacter* determined by deoxyribonucleic acid deoxyribonucleic acid hybridization. Int. J. syst. Bact., 33:275-284, 1983.
8. Leaper, S. & Owen, R.J. - Identification of catalase-producing *Campylobacter* species based on biochemical characteristics and on cellular fatty acid composition. Curr. Microbiol., 6:31-35, 1981.
9. Logan, S.M. & Trust, T.J. - Molecular identification of surface antigens of *Campylobacter jejuni*. Infect. Immun., 42:675-682, 1983.
10. Mc Fadyen, J. & Stockmann, S. - Report of the department committee appointed by the board of the agriculture and fisheries to inquire into epizootic abortions. London, Eyre and Spottiswoode, 1913.

11. Mohant, S.B.; Plumer, G.J. & Faber, J.E. - Biochemical and colonial characteristics of some bovine vibrio. Amer. J. vet. Res., 23:554-557, 1962.
12. Owen, R.J. & Leaper, S. - Base composition, size and nucleotide sequence similarities of genome deoxyribonucleic acid from species of the genus *Campylobacter*. FEMS Microbiol. Lett., 12:395-400, 1981.
13. Sebald, M. & Véron, M. - Tenuer en bases de l'ADN et classification des vibrios. Ann. Inst. Pasteur, 105:897-910, 1963.
14. Skerman, V.B.D.; McGowan, V. & Sneath, P.H.A. - Approved lists of bacterial names. Int. J. syst., 30:225-420, 1980.
15. Skirrow, M.B. & Benjamin, J. - Differentiation of enteropathogenic *Campylobacter*. J. Clin. Pat., 33:1122, 1981.
16. Skirrow, M.B. & Benjamin, J. - "100" *Campylobacter*: cultural characteristics of intestinal *Campylobacter* from man and animals. J. Hyg. (Lond), 85:427-442, 1980.
17. Smibert, R.M. - Family Spirillaceae, genus II *Campylobacter*. In: - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8. ed. Baltimore, Willians & Wilkins, p.207-212, 1974.
18. Terpestra, J.I. & Eisma, W.A. - *Vibrio fetus* infection in cattle and enzootic infertility. T. Diergeneesesk., 76:433-447, 1951.
19. Véron, M. & Chatelain, R. - Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for species. *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor), Sebald and Véron. Int. J. Syst. Bact., 23:122-134, 1973.
20. Weber, A.; Lembke, C. & Kettner, A. - Nachweis von *Campylobacter jejuni* in Kotproben von Klinisch gesunden Brieftauben. Berl. Munch. Tierarzt. Wschr., 94:449-451, 1981.

**VALOR DO EXAME DE ESFREGAÇO DE FEZES CORADO PELO MÉTODO DE GRAM MODIFICADO NO DIAGNÓSTICO DA ENTERITE CAUSADA PELO CAMPYLOBACTER JEJUNI**

Edilberto Nogueira Mendes  
Dulciene Maria de Magalhães Queiroz

Deptº de Clínica Médica  
Faculdade de Medicina/UFMG  
Av. Alfredo Balena, 190  
30130 Belo Horizonte MG, Brasil

& Eduardo Osório Cisalpino

Deptº de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas/UFMG  
Av. Antonio Carlos, s/n  
31270 Belo Horizonte MG, Brasil

**Summary**

*The value of a modified Gram staining of feces smears for diagnosis of *Campylobacter jejuni* enteritis.*

The aim of this work was to evaluate the Gram staining, using the carbol-fuchsin countertain method, as proposed by Sazie & Titus, for the diagnosis of *Campylobacter jejuni* enteritis. Curved, S-shaped or spiral microorganisms stained in red was searched in feces smears of 98 children with acute diarrhoea and 30 without diarrhoea, younger than two years. These microorganisms were detected in 14 children with acute diarrhoea (14,3%). In the this group *Campylobacter jejuni* was isolated from 10 patients. In one patient with positive culture the smear Gram stained was negative. On the other hand, none of the children without diarrhoea revealed bacteria with suggestive morphology of *Campylobacter jejuni*. The specificity, sensibility and predictive value of the modified Gram staining, when compared with culture, were 95,4%, 90,9% and 71,4%, respectively. Therefore, the modified Gram staining seems to be helpful for the diagnosis of acute diarrhoea causes by *Campylobacter jejuni*, especially in those regions where bacteriology laboratories are minimally equipped. Besides economical, this method is rapidly and easily processed and thus it might be of great value in patients with disease in which antibiotic therapy would be necessary.

**Resumo**

Foram estudadas 128 crianças (98 com diarréia aguda e 30 sem diarréia), de até dois anos de idade, que não se encontravam em uso de drogas antimicrobianas, no período de agosto/82 a janeiro/84, em Belo Horizonte, MG, com o objetivo de se pesquisar o valor do exame do esfregaço de fezes, corado pelo método de Gram

---

Trabalho realizado no laboratório de Pesquisa em Bacteriologia Médica da Faculdade de Medicina/UFMG. Parte da Tese de mestrado do primeiro autor.

modificado como proposto por Sazie & Titus, no diagnóstico da enterite causada pelo *Campylobacter jejuni*. Foram pesquisados microrganismos corados em vermelho pela carbolfucsina, curvos, em forma de "S" ou espiralados e os resultados obtidos foram comparados com os da cultura das fezes em meio de Butzler modificado. Foram visualizados microrganismos com morfologia sugestiva de *Campylobacter jejuni* em 14 pacientes com diarréia aguda (14,3%). Neste grupo, esta bactéria foi isolada em 10 pacientes. Apenas um paciente apresentou cultura negativa e exame direto positivo. Não foram visualizados microrganismos com morfologia sugestiva de *Campylobacter jejuni* nas amostras de fezes de crianças sem diarréia. A especificidade, sensibilidade e valor preditivo do Gram modificado foi de 95,4%, 90,9% e 71,4% respectivamente. Portanto, este método parece ser de grande valor no diagnóstico da diarréia aguda causada pelo *Campylobacter jejuni*, especialmente no nosso meio onde grande parte dos laboratórios de bacteriologia são dotados de poucos recursos, pois trata-se de um método diagnóstico rápido, de fácil execução e de baixo custo, devendo ser particularmente recomendado em pacientes com doença severa, nos quais o tratamento específico com antibacterianos pode ser necessário.

## Introdução

Nos últimos anos, o desenvolvimento de metodologia apropriada permitiu o reconhecimento do *Campylobacter jejuni* como agente de diarréia, tanto nos países desenvolvidos como nas nações do terceiro mundo (2, 23).

No Brasil, a frequência da diarréia aguda da infância causada pelo *Campylobacter jejuni* parece ser elevada, como demonstrada por Mendes (15), em Belo Horizonte (11,2%); por Jaramillo (9), em São Paulo (7,4%) e por Magalhães & col. (13), em Recife (18,5%).

O diagnóstico desta enterite deve ser feito através do isolamento do *Campylobacter jejuni* em meios de cultura seletivos, como os meios de Butzler (6) e Skirrow (21), entre outros. A microaerofilia, indispensável ao crescimento do microrganismo, envolve a utilização de metodologia de difícil execução ou de custo elevado, o que pode dificultar a realização rotineira de culturas para o isolamento e identificação desta bactéria. Entretanto, um diagnóstico presuntivo pode ser feito pelo exame direto de amostras de fezes coradas pelo Gram (8, 19) ou através de microscopia de contraste de fase (9, 10) ou de campo escuro (17).

Desenvolvemos este trabalho com o objetivo de verificar, no nosso meio, o valor, no diagnóstico da diarréia aguda por *Campylobacter jejuni*, do exame direto das fezes corado pelo método do Gram modificado (19), por se tratar de um método diagnóstico rápido, de baixo custo e fácil execução e que, portanto, pode ser utilizado rotineiramente pelos laboratórios de diagnóstico.

## Material e Métodos

**População estudada** - no período compreendido entre agosto de 1982 e fevereiro de 1984, foram estudadas 98 crianças com diarréia aguda e 30 crianças sem diarréia, com idade inferior a dois anos, de baixo nível sócio-econômico, que não se encontravam em uso de antibacterianos, procedentes dos Hospitais das Clínicas, Sávio Nunes e São Domingos Sávio, em Belo Horizonte, Minas Gerais.

**Colheita do material** - as amostras de fezes foram colhidas em frascos estéreis, através de sonda retal ou imediatamente após evacuação espontânea. O intervalo máximo entre a colheita do material e o seu processamento laboratorial foi de duas horas.

**Exame direto** - os esfregagos de fezes foram corados pelo método de Gram utilizando-se, como contraste, a carbolfucsina diluída a 50% (5, 19).

As lâminas foram analisadas com objetiva de 100X com o propósito de se pesquisar bastonetes finos, espiralados ou em forma de "S", com extremidades afiladas e corados em vermelho pela carbolfucsina, características sugestivas de *Campylobacter* (Fig. 1).

A pesquisa foi considerada positiva quando ao menos uma destas formas foi visualizada em cada campo microscópico (19). Os cálculos da sensibilidade, especificidade e valor preditivo do método foram feitos de acordo com Griner & col. (7).

### **Isolamento e Identificação**

As amostras de fezes foram semeadas em meio de Butzler modificado (15) e incubadas a 42°C. A atmosfera de microaerofilia foi obtida através do sistema Gas Pak (BBL) sem o catalizador de paládio (14, 20). As placas foram examinadas após 24, 48 e 72 horas de incubação, sendo descartadas quando não havia crescimento de colônias suspeitas de *Campylobacter*, ou seja, colônias lisas e brilhantes, pequenas, às vezes puntiformes, ligeiramente elevadas, translúcidas, não hemolíticas, isoladas, sob a forma de um véu delgado ou alongadas acompanhando o trajeto do inóculo (22).

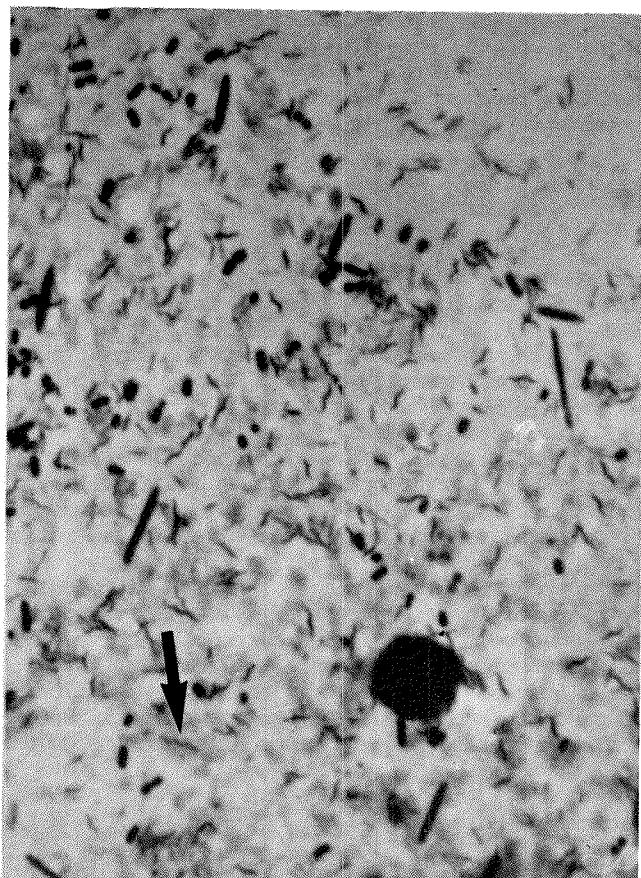
A identificação de *Campylobacter jejuni* foi feita através da motilidade característica em dardo ou saca-rolhas, das provas da oxidase e catalase positivas, da sensibilidade à 30µg de ácido nalidíxico, da incapacidade de crescimento a 25°C e da capacidade de crescer a 42°C, de produzir ácido sulfídrico e de hidrolisar o hipurato de sódio (9).

### **Resultados**

O exame direto dos esfregaços de fezes corados pelo método de Gram modificado revelou, em 14 casos (14,3%), a presença de microrganismos com morfologia sugestiva de *Campylobacter jejuni*. Entretanto, em quatro destes casos, não foi possível isolar o microrganismo. No grupo de crianças com diarréia aguda a cultura foi positiva em um caso (9,1%) no qual a pesquisa do microrganismo pelo exame direto foi negativa (Tabela 1). Considerando-se o grupo de crianças acometidas por diarréia aguda, o exame direto dos esfregaços de fezes corados pelo Gram modificado apresentou uma sensibilidade de 90,9%, especificidade de 95,4% e valor preditivo de 71,4% (Tabela 1).

No grupo controle não foram visualizados microrganismos com morfologia sugestiva

**Figura 1 - Microfotografia de esfregaço de fezes corado pelo Gram modificado de acordo com Sazie & Titus. Presença de forma espiralada (seta) e numerosas formas em "S" (objetiva de imersão).**



de *Campylobacter jejuni*, mesmo nos dois casos (6,6%) em que esta bactéria foi isolada.

## Discussão

Em relação ao valor preditivo do exame direto pelo método de Gram modificado, Pai e col. (16) obtiveram resultado semelhante ao encontrado neste estudo utilizando a microscopia de campo escuro e, empregando a mesma metodologia, Sazie & Titus (19) relataram resultado idêntico. Achado ligeiramente superior foi descrito por Jaramillo (9) através da microscopia de contraste de fase. Entretanto, com a utilização da coloração rotineira do Gram, Ho & col. (8) relataram um valor preditivo baixo (50%), o que pode-se dever à difícil visualização do microrganismo quando esta técnica é empregada.

Neste estudo, a sensibilidade do método foi idêntica à obtida por Ho & col. (8), semelhante à encontrada por Jaramillo (9) e superior à relatada por Sazie & Titus (19). Sensibilidade inferior ao deste estudo foi ainda relatada por Paisley & col. (17) que, entretanto empregaram a microscopia de campo escuro, método que torna difícil a visualização do *Campylobacter* devido à intensa reflexão da luz produzida pelo grande número de bactérias e partículas presentes nas fezes.

A especificidade calculada para o método (95,4%) foi comparável à relatada por outros autores seja empregando a mesma técnica (19) ou técnicas diferentes como microscopia de contraste de fase (9) e microscopia de campo escuro (17). É assim, pequena a probabilidade de o exame direto ser positivo na ausência da infecção intestinal por *Campylobacter jejuni*.

Neste trabalho, microrganismos com morfologia sugestiva de *Campylobacter jejuni* foram visualizados em quatro casos nos quais esta bactéria não foi isolada. Explicações possíveis para este achado incluem o fato de que o microrganismo é exigente quanto a nutrientes e atmosfera de crescimento (3, 4, 12) e os meios de culturas descritos, quando usados isoladamente, não permitem o isolamento de todas as amostras de *Campylobacter jejuni* (1, 9) sendo necessária a utilização de dois ou mais meios de cultura para que se consiga maior número de coproculturas positivas. Por outro lado, existe, ainda, a possibilidade de que as bactérias visualizadas não sejam *Campylobacter jejuni*, pois microrganismos do gênero *Vibrio* e outras espécies de *Campylobacter* podem-se apresentar com morfologia semelhante. Entretanto, as demais espécies do gênero *Campylobacter*, exceto o *Campylobacter coli* podem ser diferenciadas do *Campylobacter jejuni* com base nas diferenças morfológicas existentes entre as formas espiraladas dos diversos membros do gênero (11, 22). Com relação ao gênero *Vibrio*, não existem dados na literatura brasileira relativos à frequência com que estes microrganismos são isolados das fezes de crianças. Dados referentes à epidemiologia da enterite por estes microrganismos também são escassos. No entanto, a doença diarréica por *Vibrio*, ao menos os "não-cólera", parece estar relacionada com a ingestão de peixes e frutos do mar (18). Como esta é uma alimentação pouco comum entre crianças com idade inferior a 12 meses, especialmente no nosso meio, é pequena a possibilidade de que uma espécie do gênero *Vibrio* esteja envolvida na etiologia da enterite nestes casos.

Dessa forma, é provável que os microrganismos visualizados nestes casos sejam *Campylobacter jejuni/coli* e que a metodologia empregada neste estudo não tenha sido suficiente para o seu isolamento.

Assim, o Gram modificado (19) parece ter um grande valor no diagnóstico da doença diarréica por *Campylobacter jejuni*, especialmente no nosso meio onde, em geral, os laboratórios de diagnóstico são dotados de poucos recursos, pois trata-se de um

**Tabela 1** - Correlação entre os resultados da pesquisa pelo exame do Gram modificado e o isolamento de *Campylobacter jejuni* em crianças com diarréia aguda, em Belo Horizonte, no período de Agosto/82 a Janeiro/84..

| Cultura  | Exame direto |    |          |    |      |
|----------|--------------|----|----------|----|------|
|          | Positivo     |    | Negativo |    |      |
|          | Nº           | %  | Nº       | %  |      |
| Positiva | 11           | 10 | 90,9     | 1  | 9,1  |
| Negativa | 87           | 4  | 4,6      | 83 | 95,4 |
| Total    | 98           | 14 | 14,3     | 84 | 85,7 |

método simples, de baixo custo e rápido, o que pode ser de grande valia em pacientes com doença severa e que necessitam de tratamento específico com antibióticos.

#### Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Conselho de Pesquisa (CPq/UFMG) e da Fundação Smithkline.

#### Referências Bibliográficas

1. Billingham, J.D. - A comparison of two media for the isolation of campylobacter in the tropics. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 75: 645-646, 1981.
2. Blaser, M.J. & Reller, L.B. - *Campylobacter enteritis*. *N. Engl. J. Med.*, 305:1444-1452,
3. Blaser, M.J.; Berkowitz, I.D.; La Force, F.M. & Wang, W.L.L. - *Campylobacter enteritis*: clinical and epidemiological features. *Ann. Intern. Med.*, 91:179-185, 1979.
4. Buck, G.E.; Fojtasek, C.; Calvert, K. & Kelly, M.T. - Evaluation of the Campy Pak II gas generator system for isolation of *Campylobacter fetus* ssp *jejuni*. *J. Clin. Microbiol.*, 15:41-42, 1982.
5. Butzler, J.P. & Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*. *Clin. Gastroenterol.*, 8:737-765, 1979.
6. Butzler, J.P.; Dekeyser, P.; Detrain, M. & Dehaen, F. - Related vibrios in stools. *J. Pediatr.*, 82:493-495, 1973.
7. Griner, P.F.; Mayewski, R.J.; Mushlin, A.I. & Greenland, P. - Selection and interpretation of diagnostic testes and procedures: principles and applications. *Ann. Intern. Med.*, 94:553-600, 1981.
8. Ho, D.D.; Ault, M.J.; Ault, M.A. & Murata, G.H. - *Campylobacter enteritis*: early diagnosis with Gram's stain. *Arch. Intern. Med.*, 142:1858-1860, 1982.
9. Jaramillo, H.F. - Espécies termófilas de *Campylobacter*: Aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1983. (Tese de Doutorado).
10. Karmali, M.A. & Fleming, P.C. - *Campylobacter enteritis* in children. *J. Pediatr.*, 94:527-533, 1979.
11. Karmali, M.A.; Allen, A.K. & Fleming, P.C. - Differentiation of catalase-positive campylobacters with special reference to morphology. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31:64-71, 1981.
12. Luechtefeld, N.W.; Reller, L.B.; Blaser, M.J. & Wang, W.L.L. - Comparison of atmospheres of incubation for primary isolation of *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* from animal specimens: 5% oxygen versus candle jar. *J. Clin. Microbiol.*, 15:53-57, 1982.
13. Magalhães, M.; Andrade, M.A. & Silva, G.P. - Simple and inexpensive method for culturing *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 13:124-125, 1982.
14. Megraud, F. & Latrille, J. - *Campylobacter jejuni* en pathologie humaine. II. Diagnostic biologique et épidémiologie. *Pathol. Biol.*, 29:305-314, 1981.
15. Mendes, E.N. - Frequência de *Campylobacter jejuni* em crianças com e sem diarréia, em Belo Horizonte. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, 1985. (Tese de Mestrado).
16. Pai, C.H.; Sorger, S.; Lackman, L.; Sinai, M.D. & Marks, M.I. - *Campylobacter gastroenteritis* in children. *J. Pediatr.*, 94:589-591, 1979.
17. Paisley, J.W.; Mirret, S.; Lauer, B.A.; Roe, M. & Reller, L.B. - Dark-field microscopy of human feces for presumptive diagnosis of *Campylobacter fetus* ssp *jejuni* enteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 15:61-63, 1982.

- 18.Rodrick, G.E.; Hood, M.A. & Blake, N.J. - Human *Vibrio* gastroenteritis. *Med. Clin. N. Am.*, 66:665-673, 1982.
- 19.Sazie, E.S.M. & Titus, A.E. - Rapid diagnosis of *Campylobacter* enteritis. *Ann. Intern. Med.*, 96:62-63, 1982.
- 20.Simmons, N.A. - Isolation of campylobacters. *Br. Med. J.*, 2:707, 1977.
- 21.Skirrow, M.B. - *Campylobacter* enteritis: a new disease. *Br. Med. J.*, 2:9-11, 1977.
- 22.Smibert, R.M. - Aerobic/microaerophilic, motile, helical/vibrioid gram-negative bacteria; genus *Campylobacter*. In: Krieg, N.R. & Holt, J.G. ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. v. 1, sect. 2, p. 111-118.
- 23.WHO Scientific Working Group - *Escherichia coli* diarrhoea. *Bull. WHO.*, 58:23-36, 1980.

## ISOLAMENTO DE YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS DE BEZERROS, NA REGIÃO DE LONDRINA, PARANÁ, BRASIL

Halha Ostrensky Saridakis

Antonio José Piantino Ferreira (Bolsista CNPq)

Jacinta Sanchez Pelayo (Bolsista CNPq)

Deptº Patologia Geral

Universidade Estadual de Londrina

Caixa Postal 6001

86100 Londrina PR, Brasil

& Deise Pasetto Falcão

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara

Campus de Araraquara

Caixa Postal 331

14800 Araraquara SP, Brasil

### Resumo

São relatados o isolamento, características bioquímicas e sensibilidade a drogas antimicrobianas de 3 cepas de *Yersinia pseudotuberculosis* pertencentes ao grupo O-III. As cepas foram isoladas de bezerros com diarréia, na região de Londrina, Paraná, Brasil.

### Summary

*Isolation of Yersinia pseudotuberculosis from calves, in Londrina, Paraná, Brazil.*

*Yersinia pseudotuberculosis* O-III was isolated from calves faeces. Its biochemical identification and drug sensitivity are described. The three strains were isolated from animals with diarrhoea, in Londrina, Paraná, Brazil.

*Yersinia pseudotuberculosis* tem sido descrita como agente de doenças em animais e humanos. Alguns autores a têm responsabilizado por doenças em búfalos (Behra & col., Microbiol. Immunol., 28:237-241, 1984), suínos (Tsubokura & col., J. Clin. Microbiol., 19:754-756, 1984), e animais selvagens (Mackintosh & Henderson, N.Z. Vet. J., 32:208-210, 1984; MacArthur & Wood, Lab Anim., 17:151-155, 1983).

Em humanos, foi descrita causando quadro clínico semelhante ao da *Y. enterocolitica* (Genski & col., Infect. Immun., 28:1044-1047, 1980).

Algumas espécies de pássaros e roedores são considerados reservatórios de *Y. pseudotuberculosis*, na Europa (Mair, N.S. J. Wildl. Dis., 9:64-71, 1973).

No Brasil, *Y. pseudotuberculosis* foi descrita como agente de diarréia em suínos (Barcelos & Castro, Br. vet. J., 137:95-96, 1981). Oliveira e col. (9º Congresso Latino Americano de Microbiologia, 12º Congresso Brasileiro de Microbiologia, São Paulo, 1983), no Paraná isolaram *Y. pseudotuberculosis* O-III a partir de órgãos de búfalos.

Foi realizado estudo microbiológico em 206 amostras de fezes de bezerros, com idade entre 9 dias a 12 meses, sendo 52 (25,2%) de animais sem diarréia, de propriedades localizadas em nossa região. Essas amostras eram coletadas com swab e transportadas em seguida para o laboratório. *Yersinia pseudotuberculosis* foi isolada a partir de 3 casos de diarréia com fezes escuras e com muco.

As amostras foram semeadas em Agar Mac Conkey e Agar Yersinia, incubadas a 25 e 37°C por 24 e 48 horas. Foram também inoculadas em água peptonada 2% (pH 7.4) e incubadas a 49°C, com repiques nos 7º e 14º dia (Pai & col., J. Clin. Microbiol., 9:712-715, 1979).

Colônias com características de *Yersinia* sp no sistema Lac-EMIC 9T foram obtidas a partir do cultivo direto nos meios citados acima, em dois casos (165B e 166B) a temperatura de 37°C. Todas as cepas foram recuperadas após o crioenriquecimento.

A partir dos meios seletivos, as cepas foram submetidas a provas sorológicas e aos seguintes testes bioquímicos: oxidase, nitrato, VP, celobiose, sacarose, trealose, ramnose, melibiose, metil glicosideo, ornitina, indol, sorbose, sorbitol, rafinose, citrato, maltose, uréia, lisina, H<sub>2</sub>S, motilidade a 22 e 37°C, fenilalanina, xilose, lactose e glicose sem gás. Os resultados encontrados permitiram identificá-las com *Y. pseudotuberculosis* O-III. O caso 80 foi submetido a tratamento com Ampicilina apresentando cura completa. Os demais casos não foram acompanhados.

Os testes de sensibilidade a drogas antimicrobianas são apresentados na Tabela 1.

Embora *Y. pseudotuberculosis* seja descrita com certa frequência na Europa e outros países, pouco se conhece sobre sua epidemiologia e fontes de infecção em nosso país. Com os nossos resultados, esperamos contribuir para o esclarecimento da importância de Yersiniose em bezerros, em nosso meio.

**Tabela 1 - Susceptibilidade de *Yersinia pseudotuberculosis* a 12 agentes antimicrobianos.**

**Símbolos:** B - bovino; Cl - Cloranfenicol; Ap - Ampicilina; Ge - Gentamicina; Tri - Trimexazol; Tt - Tetraciclina; Pn - Penicilina G; Am - Amicacina; Ct - Cefatolina; Es - Estreptomicina; Ka - Kanamicina; Su - Sulfanilamida; To - Tobramicina.

| Amostras<br>Drogas | Cl | Tt | Es | Ap | Pn | Ka | Ge | Am | Su | Tri | Ct | To |
|--------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|----|
| 80B                | S  | R  | S  | S  | S  | S  | S  | S  | R  | R   | R  | R  |
| 165B               | S  | R  | S  | S  | S  | R  | S  | S  | R  | S   | S  | S  |
| 166B               | S  | S  | S  | S  | S  | S  | S  | S  | S  | R   | R  | S  |

#### Agradecimentos

Os autores agradecem o auxílio financeiro concedido pela CPG/UEL e FINEP.

## PSEUDOMONAS AERUGINOSA COMO AGENTE DE ENCEFALITE EM SUÍNOS

Marcio Hipolito

Seção de Bacteriologia Animal  
Instituto Biológico

Josete Garcia Bersano

Seção de Doenças de Suínos, Eqüinos e Pequenos Mamíferos  
Instituto Biológico

Aurélia Archanja Procaci Moulin

Ercília Maria Borgheresi Calil  
& Lúcia Baldassi

Seção de Bacteriologia Animal

Instituto Biológico

Av. Cons. Rodrigues Alves, 1252  
04014 São Paulo SP, Brasil

### Resumo

Relata-se duas ocorrências de encefalite em suínos causadas por *Pseudomonas aeruginosa* hemolítica, isoladas em cultura pura a partir de fragmentos de encéfalo e cerebelo, oriundos de animais com suspeita clínica de meningite estreptocócica. Esta é uma notificação primária deste tipo de patologia, não tendo sido encontrado, na bibliografia consultada, qualquer caso semelhante. Resalta-se a importância do diagnóstico diferencial com outros processos onde haja comprometimento nervoso, sendo igualmente um alerta aos médicos veterinários clínicos, pois embora rara, esta patologia poderá tornar-se um risco comum na criação de suínos.

### Summary

#### *Pseudomonas aeruginosa as agent of swine encephalite*

Two cases of swine encephalites caused by haemolytic *Pseudomonas aeruginosa*, are described. The agent was isolated in pure culture from encephalon and cerebellum. The cases were diagnosed as streptococcal meningitis based upon the symptoms showed by those animals. No other case like that was found in the literature consulted so we think it is important to verify the difference between this pathology and others associated with the nervous system, that show similar symptomatology. And we call your attention to those cases that are unusual but in near future can be common.

### Introdução

A *Pseudomonas aeruginosa* é um agente bacteriano conhecidamente causador de acessos e septicemias em diversos animais e agente etiológico da piocianose, comum a várias espécies (5). Por ter uma distribuição cosmopolita, uma grande gama de animais é presa dos processos patológicos por ela causados (8, 11). Sua importância é relegada a segundo plano por ser componente habitual da microbiota, sendo portanto os trabalhos publicados sobre suas ocorrências, restritos.

Histórico - A encefalite por *Pseudomonas aeruginosa* ocorreu em animais de dois diferentes Municípios do Estado de São Paulo. A primeira, no Município de Guarulhos, atingindo 6 animais entre 2 a 3 meses de idade, de um lote de 20. Observou-se sintomatologia nervosa e instituiu-se antibioticoterapia, sendo que 4 deles se restabeleceram. Dois animais não apresentaram regressão dos sintomas e foram encaminhados ao Instituto Biológico. Eram os mesmos provenientes de uma criação alimentada basicamente com resíduos de restaurantes da própria empresa a que a criação pertence.

A segunda ocorrência, no Município de São José dos Campos, acometeu 15 leitões com idade entre 30 e 40 dias. Os animais apresentaram inicialmente, pelos eriçados e em seguida dificuldade em locomover-se. A diarréia foi constatada em alguns animais, além de edema da cabeça. Não se observou hipertemia e o plantel estava sendo medicado com um produto à base de oxitetraciclina, devido à ocorrência de uma salmonelose anterior. Estes animais eram alimentados com ração e mantidos sob favoráveis condições de manejo e higiene. Um animal portador de sintomatologia nervosa bem evidente, foi enviado ao Instituto Biológico para observação e coleta de materiais.

#### Material e Métodos

Os animais enviados à Seção de Doenças de Suínos, Equinos e Pequenos Mamíferos, do Instituto Biológico, foram sacrificados realizando-se necrópsias, com coleta de fragmentos do sistema nervoso central (encéfalo e cerebelo). Estes fragmentos foram encaminhados a fresco para a Seção de Bacteriologia Animal, devido à suspeita de meningite estreptocócica.

O material foi triturado em graal, com auxílio de areia e solução salina estéreis e a seguir semeado em caldo simples, ágar sangue e ágar MacConkey.

Os meios de cultura foram incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, apresentando, após este período, crescimento tanto no caldo quanto nas placas. Na placa de ágar sangue cresceu um único tipo de colônia, de cor cinzenta, lisa, redonda, com tamanhos variados e hemolítica. Em ágar MacConkey, também houve a proliferação de um único tipo de colônia, de cor clara, transparente, lisa e de tamanho variado.

De colônias crescidas nas placas de ágar sangue foram preparados esfregaços para realização de bacterioscopia em microscópio óptico comum, fazendo-se a coloração de Gram.

Colônias foram isoladas para realização de provas bioquímicas, que constaram da verificação da presença da oxidase; crescimento em caldo cetrímide (seletivo para *Pseudomonas*); produção de pigmento; solubilidade do pigmento em clorofórmio; utilização da acetamida; citrato e malonato como fontes de carbono; acidificação da maltose; hidrólises da esculina; uréia e arginina; produção do indol e crescimento em caldo infuso de cérebro e coração a 41°C e a 4°C.

#### Resultados

A bacterioscopia revelou tratar-se de bastonetes delicados com características Gram negativas. Os resultados das provas bioquímicas revelaram a positividade da presença da oxidase; produção de pigmento verde, constatando-se sua solubilidade em clorofórmio. Houve crescimento em caldo cetrímide; utilização da acetamida, malonato e citrato positivos; hidrólise da esculina e da arginina, bem como, crescimento a 41°C. A negatividade ocorreu na acidificação da maltose; na hidrólise da uréia; na produção do indol e no crescimento a 4°C.

Os resultados bioquímicos, o tipo do pigmento e sua solubilidade em clorofórmio, permitiram identificar este agente bacteriano como *Pseudomonas aeruginosa* (1).

#### Discussão

A *Pseudomonas aeruginosa* como agente patógeno para suínos é comum (9). Porém em

casos de processos localizados e com sintomatologia específica de um sistema ou órgão afetado, poucas são as notificações na bibliografia.

Os processos patológicos por esta bactéria descritos nesta espécie animal, referem-se a otites, enterites e infecções do trato respiratório (8); a abortamentos e abcessos (7); septicemias (6) e diarréias (3).

Sua presença no trato respiratório superior dos suínos sadios é notificada (2, 12) onde assumem um risco potencial e em leitões de criações numerosas, pode constituir-se em agente causal significativo de mortes por pneumonia (10).

A *Pseudomonas aeruginosa* acha-se distribuída normalmente na água e no solo, podendo ser contaminante da pele dos animais e, através de solução de continuidade do tegumento, pode atingir tecidos profundos, ocasionando processos mórbidos (9).

Como agente de encefalites em animais é relatada sua ocorrência em bovinos (4). Entretanto, nos suínos não há notificações até a presente data, constituindo-se esta, a primeira do gênero.

O diagnóstico clínico da meningite estreptocócica, sem sua confirmação laboratorial e o presente isolamento do agente em questão causando encefalite, determina uma necessidade de se utilizar um cuidadoso diagnóstico laboratorial visando a correta diferenciação de outras encefalites, bacterianas ou mesmo virais, que podem acometer a suinocultura.

A partir do momento que este agente passa a provocar um processo patológico incomum, seu significado como microrganismo de presença habitual ou de agente comumente encontrado em processos mórbidos variados, deve ser reconsiderado.

Neste trabalho relata-se a ocorrência de encefalite em suínos, única descrição até o momento e muito rara em outras espécies animais. Deve ser destacada a importância do diagnóstico diferencial, para o correto estabelecimento da responsabilidade deste agente bacteriano neste tipo de patologia.

### Referências Bibliográficas

1. Krieg, N.R. & Holt, J.G., - eds. - *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins, v.1, 960p., 1984.
2. Bhatnagar, A.; Singh, N.B. & Malik, B.S. - Bacterial flora from the respiratory tract of pigs. Indian Vet. J., 49:234-236, 1972.
3. Choudhary, S.P.; Singh, S.N. & Narayan, K.G. - *Pseudomonas aeruginosa* an aetiologic agent of piglet diarrhoea. Indian J. Anim. Sci., 53:629-634, 1983.
4. Clausen, H.H.; Eigenmann, U.J.E.; Amtsberg, G.; Martins, J. & Meier, K. - Clinical-neurological and bacteriological evaluation of bacteria meningoencephalitis in cattle. Schweiz. Arch. Tierheilk., 122:661-672, 1980.
5. Correa, W.M. & Correa, C.N.M. - Enfermedades infecciosas dos mamíferos domésticos. São Paulo, J.M. Varella Livros, 1979.
6. Danchey, P.; Kharlampiev, P. & Ptakov, P. - Septicaemia caused by *Pseudomonas aeruginosa* in piglets. Veterinaria Sbirka, 79: 30-32, 1981.
7. Dunne, H.W. - Enfermedades del cerdo. México, Unión Tipográfica Editorial Hispano-Americana, 1967.
8. Lusis, P.I. & Soltys, M.A. - *Pseudomonas aeruginosa*. Vet. Bull., 41:169-177, 1971.
9. Merchant, I.A. & Packer, R.A. - Bacteriología y virología veterinarias. 3ed., Zaragoza, Editorial Acribia, 1970.
10. Spicer, E.M.; Driesen, S.J.; Fahy, V.A.; Horton, B.J.; Sines, L.D.; Jones, R.T.; Cutler, R.S. & Prime, R.W. - Causes of preweaning mortality on a large intensive piggery. Aust. Vet. J., 63:71-75, 1986.
11. The Merck Veterinary manual. 4ed., Rahway, Merck & Co., 1978.
12. Valenti, G. - Bacteriological investigation of the tonsils of healthy normally slaughtered pigs. II - Presense of *Pseudomonas aeruginosa*. An. Fac. Med. Vet. (Torino), 18:207-220, 1971.

## SOROTIPOS DE SALMONELLA ISOLADOS DE PRODUTOS CÁRNEOS EM LONDRINA - PARANÁ

Jacinta Sanchez Pelayo  
& Halha Ostrensky Saridakis

Depto de Patologia Geral  
Universidade Estadual de Londrina  
Caixa Postal 6001  
86000 Londrina PR, Brasil

### **Resumo**

A partir de 194 amostras de produtos cárneos, sendo 101 de carne moída de segunda qualidade e 93 de quibe cru, coletadas em 4 açougues, considerados de bom nível na região de Londrina, foram isoladas 12 cepas de *Salmonella* pertencentes a 3 diferentes sorotipos: *S. give* (1), *S. london* (2), *S. infantis* (9). Essas bactérias foram estudadas quanto a sua sensibilidade ou resistência a 8 drogas: Gentamicina (Gn), Trimexazol (Tri), Cloranfenicol (Cl), Ampicilina (Ap), Tetraciclina (Tt), Sulfanilamida (Su), Estreptomicina (Et), Cefalotina (Ce). As cepas isoladas apresentaram baixa resistência a drogas, com exceção da Sulfanilamida frente a qual, a resistência foi de 100%.

### **Summary**

#### *Serotypes of Salmonella isolated from meat products in Londrina - Paraná*

From 194 samples of meat products of which 101 were ground meat of second quality, and 93 of raw keebe, collected from four butchers considered to be of good higienic status, there were isolated 12 strains of *Salmonella* belonging to 3 different serotypes: *S. give* (1), *S. london* (2), *S. infantis* (9). The strains were tested for their sensibility or resistance to 8 drugs: Gentamicine (Gn), Trimexazol (Tri), Chloranfenicol (Cl), Ampicylin (Ap), Tetracyclin (Tt), Sulfanilamide (Su), Streptomycin (Et), Cephalotin (Ce). We verified a low resistance of the strains to all drugs with the exception of Sulfanilamide to which the resistance was 100%.

### **Introdução**

Como geralmente as condições higiênico-sanitárias no abate de animais e o transporte da carne até os pontos de comercialização, em nosso meio, são precárias, verifica-se a presença de microrganismos patogênicos, principalmente *Salmonella*, em produtos cárneos o que constitui sério problema para a saúde pública, uma vez que são causadoras de toxinfecção alimentar (15, 23).

A carne moída e o quibe cru, por serem produtos mais manipulados, estão sujeitos a maior risco de contaminações (22).

Wilson & Miles (25) estudando a etiologia de 413 surtos de toxinfecção alimentar por *Salmonella* verificaram que as carnes processadas foram responsáveis por 84% dos casos, enlatados por 8,5% e a carne fresca apenas por 1% dos casos. Rislakki (21)

na África do Sul, analisando carnes bovinas em açouges, isolou 7,4% de *Salmonella*.

No Brasil, existem alguns trabalhos sobre isolamento de *Salmonella* de alimentos. Assumpção (1) analisando carnes frescas na região de São Paulo, isolou 15% de *Salmonella*; Cerqueira Campos (7) constatou positividade de 14% em 50 amostras de carne moída. Iaria & col (13) isolaram diferentes sorotipos de *Salmonella* em quibe cru. Paula (20), de um total de 200 amostras de carne moída de açouges localizados no Município de Niterói e São Gonçalo, isolou 14% de *Salmonella*.

Oliveira & col (19) analisando 406 amostras de carne bovina, isolaram 20 sorotipos de *Salmonella*. Falcão & col (10) em 20 amostras de linguiça fresca, isolaram 15% de *Salmonella*. Silva (22) estudando misturas de carne moída e soja, que eram previamente analisadas em separado, não isolou *Salmonella* em qualquer das amostras.

Quanto ao isolamento de *Salmonella* a partir de alimentos, o ICMSF (14), afirma que não é possível recomendar um método específico único, satisfatório a todos os sorotipos dessa bactéria.

Bryan & col (5) confirmam que um dos problemas básicos no isolamento de *Salmonella* é o seu pequeno número em relação à quantidade de outras bactérias competidoras, ocorrendo isto, principalmente, em alimentos. Devido a este problema, geralmente os métodos seguem etapas sequenciais como o pré-enriquecimento não seletivo, enriquecimento seletivo, isolamento em placas de ágar seletivo e sua identificação final, bioquímica e sorológico.

Outro problema preocupante é o uso indiscriminado de antibióticos em ração animais, como promotores de crescimento, bem como o uso, muitas vezes, do mesmo antibiótico no tratamento de doenças humanas e animais, contribuindo para o aumento de microrganismos resistentes a diversas drogas (9, 17).

Como a carne moída de segunda qualidade e o quibe cru são duas das formas de carne bastante consumidas pela população, objetivou-se neste trabalho o isolamento e identificação de *Salmonella*, a partir desses produtos, bem como verificar o comportamento desses microrganismos, frente a diferentes drogas antimicrobianas.

## Material e Métodos

Como vários autores indicam a necessidade do pré-enriquecimento, previamente ao desenvolvimento da pesquisa fez-se um teste comparativo da importância dessa etapa (6). Duas amostras de 25 g de amostras de carne moída de segunda qualidade, foram transferidas a 225 ml de caldo peptonado e a 225ml de Tetrationato com novobiocina respectivamente. Após, foram contaminados com 1 ml de suspensão de *Salmonella* sp de origem humana, na concentração de  $1 \times 10^6$  cels/ml (padronizada na escala de Mac Farland). Este número foi escolhido por se tratar da concentração necessária para causar doença humana. Em seguida, foram incubadas a 35 - 37°C por 24 horas. A partir do caldo Tetrationato, 1ml da suspensão era semeado em Agar *Salmonella-Shigella* (ASS) e Agar Verde Brilhante (AVB), pelo método de diluição em pour-plate em duplicata. Após a incubação a 35 - 37°C por 24 horas eram feitas as contagens nas melhores diluições, série bioquímica e sorologia comprovando que a bactéria inoculada foi a isolada. Em paralelo, a mesma amostra de carne foi semeada sem a contaminação, para verificar a pré-existência de *Salmonella*.

Um total de 101 amostras de carne bovina moída de segunda qualidade e 93 de quibe cru, foram adquiridas em 4 açouges considerados de bom nível higiênico na região de Londrina. Estas amostras foram coletadas semanalmente durante 9 meses, nas condições em que eram entregues ao consumidor e transportadas imediatamente ao laboratório, onde eram processadas em, no máximo, 1 hora.

Em condições assépticas, 25 g de cada produto eram pesados e colocados em 225 ml de caldo de enriquecimento Tetrationato (TT) adicionado de novobiocina a 0,4% (12), homogeneizados por 10 minutos, e incubados a 35 - 37°C por 24 horas.

A partir do meio de enriquecimento eram repicadas em placas de Agar Verde Brilhante (AVB) e Agar *Salmonella-Shigella* (ASS), em duplicata. Após incubação a 35 - 37°C por 24 horas, selecionava-se de cada placa, colônias com características de *Salmonella*, que eram identificadas pelos testes bioquímicos propostos por Fontes (11), utilizando-se 3 meios de cultura; o EPM que fornece informações quanto a

produção de gás, a partir de glicose, H<sub>2</sub>S, urease e triptofano-desaminase; o MLI que fornece a motilidade, produção de indol, L-lisina descarboxilase e o citrato de Simon's.

Após a realização das provas bioquímicas as cepas que apresentavam características de *Salmonella*, eram testadas com soros polivalentes e posteriormente enviadas ao Instituto Adolfo Lutz de São Paulo para identificação dos sorotipos.

A determinação da resistência a drogas antimicrobianas foi realizada de acordo com a técnica recomendada por Bauer & col (3), usando as seguintes drogas: Gentamicina (Gn), Trimexazol (Tri), Cloranfenicol (Cl), Ampicilina (Ap), Tetraciclina (Tt), Sulfanilamida (Su), Estreptomicina (ET), Cefalotina (Ce).

## Resultados e Discussão

Verificando na literatura que havia muita controvérsia quanto à metodologia utilizada para o isolamento de *Salmonella* (8), optou-se por uma técnica a partir dos resultados obtidos na Tabela 1.

Observou-se que os resultados com e sem pré-enriquecimento, não apresentaram variações significativas; assim, aboliu-se o pré-enriquecimento, uma vez que se obtém uma redução de 24 horas no tempo de incubação. Os resultados apresentados na Tabela 1 estão de acordo com Thomason & Dodd (24) e Bailly & col (2).

A temperatura utilizada foi a de 37°C de acordo com MacCoy (18), o qual pesquisando águas poluídas, verificou que o uso de TT incubado a 43°C era letal à *Salmonella*.

O uso de caldo Tetrationato foi baseado em Le Minor & col (16), os quais verificaram que o uso desse meio é superior ao caldo Selenito.

Dos resultados obtidos no presente estudo (Tabela 2) verifica-se que das 12 (6,22%) *Salmonella* isoladas, 6 foram a partir de quibe cru e 6 de carne moída. De uma das amostras de carne, isolou-se 2 cepas de *Salmonella infantis* com diferentes biotipos, isto é, indol positivo em um dos casos e negativo no outro. Também houve variação, em ambas, no teste de sensibilidade a drogas (Tabela 3), ou seja, a amostra 100 C<sub>1</sub> foi resistente a Ampicilina (Ap) e a Tetraciclina (Tt), enquanto que a 100 C<sub>2</sub> foi sensível a Ampicilina (Ap) e apresentou sensibilidade intermediária a Tetraciclina (Tt).

Analizando os resultados apresentados, podemos concluir que *S. infantis* foi isolada com maior frequência e somente em uma amostra isolou-se *S. gíve*.

Esperava-se isolar um maior número de cepas de *Salmonella* a partir de quibe cru, por se tratar de um produto mais manipulado, no entanto isto não ocorreu.

**Tabela 1** - Comparação na contagem de colônias de *Salmonella* obtidas sem e com pré-enriquecimento.  
**Símbolos:** \*T.T. - Caldo Tetrationato (enriquecimento direto); PEP - Caldo peptonado 1% (pré-enriquecimento); AVB - Agar verde brilhante; ASS - Agar *Salmonella* - *Shigella*.

| Meios Seletivos | Pré-Tratamento | T.T.*                        |                              | PEP - T.T. |
|-----------------|----------------|------------------------------|------------------------------|------------|
|                 |                | AVB                          | ASS                          |            |
|                 |                | 1,3 x 10 <sup>8</sup> col/ml | 1,8 x 10 <sup>8</sup> col/ml |            |
|                 |                | 1,0 x 10 <sup>8</sup> col/ml | 1,2 x 10 <sup>8</sup> col/ml |            |

**Tabela 2** - Freqüências de sorotipos de *Salmonella* isolados de amostras de carne moída de segunda e de quibe cru

**Símbolos:** K n°: número da amostra de quibe cru; C n°: número da amostra de carne moída de segunda; a) cepas isoladas de uma mesma amostra; b) % relação ao total de *Salmonella* isoladas

| Amostra Analisada                       | Número de Amostra(s) | Sorotipos Isolados | Freqüência dos Sorotipos (%) |
|---|----------------------|--------------------|------------------------------|
| 52C                                     | 1                    | <i>S. gíve</i>     | 8,33                         |
| 51K                                     | 2                    | <i>S. london</i>   | 16,66                        |
| 53C                                     |                      |                    |                              |
| 67C                                     |                      |                    |                              |
| 73C                                     |                      |                    |                              |
| 85C                                     |                      |                    |                              |
| 100C <sub>1</sub> (indol-) <sup>a</sup> |                      |                    |                              |
| 100C <sub>2</sub> (indol+) <sup>a</sup> | 8                    | <i>S. infantis</i> | 75,00                        |
| 59K                                     |                      |                    |                              |
| 73K                                     |                      |                    |                              |
| 75K                                     |                      |                    |                              |
| 91K                                     |                      |                    |                              |

Considerando que os estabelecimentos nos quais as amostras foram obtidas eram de bom nível higiênico, nossos resultados podem ser considerados compatíveis com os outros autores já citados (1, 13, 15, 17).

Comparando nossos resultados com o de Cerqueira-Campos (7) é provável que o maior isolamento de *Salmonella* (14%) por esse autor se deva à qualidade dos estabelecimentos onde as amostras foram adquiridas.

Falcão & col (9), estudando 68 cepas de enterobactérias isoladas de produtos cárneos, das quais 4 eram *Salmonella*, verificaram que as 4 eram sensíveis às 11 drogas testadas.

Analisando nosso resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos (Tabelas 3 e 4) observa-se que nenhuma das cepas de *Salmonella* foi sensível a Sulfanilamida (Su) e resistente ao Cloranfenicol (Cl), Gentamicina (Gn), Trimexazol (Tri) e Cefalotina (Ce). Chama-se a atenção para 2 cepas que apresentaram resistência a Ampicilina (Ap) sendo que esta droga é tida como um dos antibióticos de escolha no tratamento de salmonelose humana.

O grande número de resultados "Intermediário", Tetraciclina (83,3%) e Estreptomicina (75%), pode sugerir o emprego indiscriminado de antibióticos, tanto como aditivo de ração animal como na terapia, condicionando o desequilíbrio ecológico da flora residente no hospedeiro (4).

Concluindo, para reduzir a contaminação de produtos cárneos por *Salmonella* devem ser consideradas melhorias nas condições higiênico-sanitárias dos locais de abate, armazenamento, transporte e o cuidado com portadores saudáveis que manuseiam os alimentos e ainda o uso indiscriminado dos antibióticos.

#### Agradecimentos

Agradecemos aos órgãos financiadores FINEP e CPG/UEL, ao Instituto Adolfo Lutz pela sorotipagem e a Dra. Deise P. Falcão pelas críticas e sugestões.

#### Referências Bibliográficas

- Assumpção, L. - Pesquisa de bactérias do gênero *Salmonella* em carnes e seus derivados vendido a retalho. Arq. Hig. Saúde Publ., 29:473-486, 1946.
- Bailly, J.C.; Cosca, N.A. & Thomson, J.E. - Efficiency of Selenite Cystine and T.T. enrichment broths for the detection of *Salmonella*. J. Appl. Bact., 51:409-414, 1981.

**Tabela 3** - Teste de sensibilidade a drogas antimicrobianas de *Salmonella* isoladas de carne moída de segunda (C) e quibe cru (K).

Símbolos: Gn = Gentamicina; Tri = Trimexazol; Cl = cloranfenicol; Ap = Ampicilina; Tt = Tetraciclina; Su = Sulfanilamida; Et = Estreptomicina; Ce = Cefalotina.

S = sensível; R = resistente; I = intermediária

| Amostra           | Sorotipos Isolados | Drogas |     |    |    |    |    |    |    |
|-------------------|--------------------|--------|-----|----|----|----|----|----|----|
|                   |                    | Gn     | Tri | Cl | Ap | Tt | Su | Et | Ce |
| 52C               | <i>S. give</i>     | S      | S   | S  | S  | I  | R  | R  | S  |
| 53C               | <i>S. london</i>   | S      | S   | S  | S  | I  | R  | I  | S  |
| 67C               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | S  | R  | S  | S  |
| 73C               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | I  | R  | I  | S  |
| 85C               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | R  | I  | R  | I  | S  |
| 100C <sub>1</sub> | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | R  | R  | R  | I  | S  |
| 100C <sub>2</sub> | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | I  | R  | I  | S  |
| 51K               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | I  | R  | I  | S  |
| 59K               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | I  | R  | I  | S  |
| 73K               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | I  | R  | S  | S  |
| 75K               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | I  | R  | I  | S  |
| 91K               | <i>S. infantis</i> | S      | S   | S  | S  | I  | R  | I  | S  |

**Tabela 4** - Modelos de resistência a drogas antimicrobianas apresentados por cepas de *Salmonella* isoladas de carne moída de segunda e quibe cru.

Símbolos: (-): nenhuma cepa com tal modelo de resistência. Su = Sulfanilamida; Et = Estreptomicina; Ap = Ampicilina; Tt = Tetraciclina.

| Modelos de resistência      | Número de Cepas | %    |
|-----------------------------|-----------------|------|
| Su                          | 9               | 75,0 |
| Su Et                       | 1               | 8,33 |
| Su Ap                       | 1               | 8,33 |
| Su Ap Tt                    | 1               | 8,33 |
| Sensíveis a todas as drogas | -               | -    |

3. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Ann. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
4. Blood, D.C.; Henderson, J.A. & Radostits, O.M. - *Clinica veterinária*; 5.ed. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1983.
5. Bryan, F.L.; Fanelli, M.J.; Riemann, H. - *Salmonella infections*. In: Riemann, H. & Bryan, F.L. - *Food-borne infections and intoxication*. 2.ed. New York, Academic Press, 74-129, 1979.
6. Busta, F.F. - Introducion to injury and repair of microbial cells. *Adv. Appl. Microbiol.*, New York, Academic Press, 23:195-201, 1978.
7. 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)*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas USP (Tese de Doutorado). 1980.
8. Edel, W. & Kampelmacher, E.H. - Comparative studies on *Salmonella* isolations from feeds in ten laboratories. *Bull. Wed Alth Org.*, 50:421-426, 1974.
9. Falcão, D.P.; Lima, B.M.; Marini, E. & Shimizu, M.T. - Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos. *Rev. Microbiol. São Paulo*, 13:402-411, 1982.
10. Falcão, D.P.; Lopes, M.; Bussadori, N.M.; Oda, A.H.; Oliveira, A.G.; Pimentel, E.P. & Rossi, E.A. - Microrganismos em alimentos crus embutidos. *Rev. Fac. Ciências Farm. Araraquara*, 1 (nº único):39-48, 1978.
11. Fontes, C.F. - Proposição de dois novos meios de cultura e de um sistema simplificado para identificação de enterobactérias. Escola Paulista de Medicina, 1982. (Tese de Mestrado).
12. Harvey, R.W.S. & Price, T.H. - A review, principles of *Salmonella* isolation. *J. Appl. Bact.*, 46:27-56, 1979.
13. Iaria, S.T.; Queiroz, J.C.; Paim, G.V. & Mello, D. - Contaminação do quibe cru vendido na zona central da cidade de São Paulo, por microrganismos de origem fecal. *Arq. Fac. Hig. São Paulo*, 19:111-121, 1965.
14. International Comission on Microbiological Specifications for Foods: microorganisms in foods. 1- Their significance and methods of enumeration. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
15. Leitão, M.F.F. - Controle do desenvolvimento microbiano no processamento industrial da carne e produtos cárneos. *Bol. ITAL, Campinas*, 21:21-39, 1984.
16. Le Minor, L.; Bonnefoi, A. & Grabar, J. - Diagnostic biologique des infections à *Salmonella*. IV - L'isolament des *Salmonella* par copro culture. Étude critique des methods moderns. *An. Inst. Pasteur, Paris*, 73:604-607, 1947.
17. MacWhorter, A.C.; Murrel, M.C. & Edwards, P.R. - Resistance of *Salmonella* isolated in 1962 to chlortetracycline. *Appl. Microbiol.*, 11:368-370, 1963.
18. McCoy, J.H. - The isolation of *Salmonella*. *J. Appl. Bacteriol.*, 25:213-224, 1962.
19. Oliveira, A.R. - Ocorrência e técnica de isolamento de *Salmonella* em carnes comercializadas em retalho na cidade de Belo Horizonte. Belo Horizonte, U.F.MG/1981. (Tese de Mestrado).
20. Paula, O. - *Salmonela em carnes trituradas*. Rio de Janeiro, 1975. (Tese de Mestrado).
21. Rislakki, V. - Investigation on *Salmonella* in Pretoria slaughter-house and butcher shops. *Nord. Veterinaer. Med.*, 21:260-265, 1969.
22. Silva, S.R.C. - Aspectos microbiológicos de carne e soja. Universidade Estadual de Londrina, 1982. (Tese de Mestrado).
23. Taunay, A.E. - Diagnóstico bacteriológico das salmonelas de origem animal, sua importância e frequência no município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 28:43-69, 1968.
24. Thomason, B.M. & Dood, D. - Enrichment procedures for isolating *Salmonella* from raw meat and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:627-628, 1978.
25. Wilson, G. & Miles, A. - *Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*. 5.ed. London - Edward Arnold, vol. 2, 1966.

## COMPARATIVE STUDIES OF TWO NEW CEPHALOSPORINS WITH OTHER ANTIMICROBIAL DRUGS AGAINST GRAM NEGATIVE RODS

Claudia Esteves Oliveira Pires de Campos

Dept de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biociências UNESP  
18600 Botucatu SP, Brasil

Evanil Pires de Campos Filho

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
UNESP - Campus de Botucatu

Evanil Pires de Campos

Dept de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Dermatologia e Radiologia  
Faculdade de Medicina UNESP  
Campus de Botucatu

### Summary

I was studied 100 Gram negative rods isolated from nosocomial patients, dealing with urinary infection (52), blood culture and secretion (31) and diarrhoea (17). The Enterobacteria strains were predominant (34) and *Pseudomonas* spp (6). The minimum inhibitory concentration 90% (MIC 90%) were tested with the drugs: RO 19-5248 (new discovered cephalosporins), ceftriaxone, cefoxitin, amoxacillin, ampicillin and cotrimoxazole. In urinary infections *E. coli* showed a MIC 90% of 0.1 ug/ml for ceftriaxone and 0.4 ug/ml for RO-19. The MIC 90% for faecal bacterial strains were of 0.4 ug/ml, 2.6 ug/ml and 3.7 ug/ml with RO 19, ceftriaxone and cefoxitin respectively. Concerning the bacterial strains isolated from blood cultures the MIC 90% were of 10.4 ug/ml for both drugs ceftriaxone and Ro 19. The new cephalosporins were the most efficient antimicrobial drugs.

### Resumo

*Estudo comparativo de duas novas cefalosporinas com outras drogas antimicrobianas frente a bastonetes Gram negativos*

Foram estudadas 100 amostras de bastonetes Gram negativos isolados de infecção urinária (52), hemocultura e cultura de secreções (31) e diarréia (17) de pacientes hospitalizados. As Enterobactérias foram predominantes e *Pseudomonas* spp (6). O estudo da concentração inibitória mínima 90% (CIM, 90%) foi realizado com as seguintes drogas: RO 19-5248 (nova defalosporina), ceftriaxone, cefoxitina, amoxacilina, ampicilina e cotrimoxazol. A *E. coli* isolada de infecção urinária revelou CIM 90% de 0.1 ug/ml e 0.4 ug/ml respectivamente para ceftriaxone e RO 19. O CIM 90% para as bactérias isoladas das fezes foi de 2.6 ug/ml respectivamente para ceftriaxone e RO 19. Em relação às bactérias isoladas de hemocultura e secreções os menores valores de CIM 90% foram 10.4 ug/ml para ambas as novas cefalosporinas. A CIM 90% para os sete antimicrobianos avaliados frente às 100 amostras evidenciou valo-

res a 1.0 ug/ml e 2.0 ug/ml respectivamente para ceftriaxone e RO 19. Esses resultados mostraram que as duas novas cefalosporinas possuem maior eficácia de ação "in vitro", diante das diferentes espécies de bastonetes Gram negativos estudados.

## Introduction

The study of bacterial infection since 30 years ago frequently shows a emergence of resistant strains to the most common antimicrobial drugs used for patients therapy. The selective pressure of several antimicrobial drugs and the period of inmate acts on the normal and pathogenic flora of these patients (1, 2, 3, 10, 12). This fact express why these bacterial agents are easily found on the medical hospital environment because allows the development of several resistant mechanisms in the microrganisms (1, 3, 7, 8, 10). With the utilization of antibiotic therapy each year verify the changing of principal bacterial agents responsible by hospital infection.

The discovery of new antimicrobial drugs have been necessary for the elimination of these adapted agents to new hospital dinamics. However facing this facts, we resolved to study "in vitro" two new cephalosporins of third generation: ceftriaxone and RO 19-5248 (new cephalosporin) compared with five other antimicrobial drugs against Gram negative rods isolated from nosocomial patients.

## Material and Methods

**Strains:** We studied 100 strains of Gram negative rods (*Enterobacteri*a and *Pseudomonas* spp) isolated from infectious process of patients from Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, UNESP, Brazil. The identification of these strains followed the methods preconized by Cowan & Steel (5) and Edwards & Ewing (6). Susceptibility testing-minimum inhibitory concentration determinations were carried out by the agar incorporation methods. Overnight Brain Heart Infusion Broth (Merck) cultures, adjusted to give approximately  $1 \times 10^4$ cfu/ml were used as inocula and dispensed using a multipoint inoculator on Mueller Hinton Agar (Difco) (12). Each inoculating pin delivered 25ul of inoculum. Inoculated plates were incubated aerobically at 37°C and examined for growth after 24h. The lowest concentration which gave a complete absence of growth was recorded as the MIC. Utilized drugs: RO 19-5248 (a pivoyloxyloxymethylene - PIV - os a newly discovery cephalosporin), ceftriaxone, amoxacillim and cotrimoxazole (Products Roche); cefoxitin (Merck Sharp & Dohrme - a vial of Mefoxin bought commercially), cephalexin (Eli Lilly Pharmaceutical Laboratories) and ampicillin (Laborterapica Bristol Laboratories).

The MIC 90% is the MIC of the drugs which inhibited 90% of studied strains for its establishment papers published (7, 11, 12).

## Results

Table 1 shows the number and percentage of assayed bacteria against the several antimicrobial drugs, being *E. coli* (42%) the most isolated strains.

Table 2 shows the number and percentage of isolated strains from urinary infections, blood and secretion and faeces. The highest percentage of isolation from urinary infections was due to *E. coli* (53.9%). Concerning blood and secretion cultures, the most often isolated strains was *Klebsiella* spp (19.4%) and followed by *Enterobacter* spp (19.4%) and *E. coli* (16.2%). Faecal culture reveals *E. coli* serotype O125: K70 as the most isolated strains (29.4%) followed by *Shigella flexneri* (17.7%) and *Shigella sonnei* (17.7%).

Table 3 reveals the minimum inhibitory concentrations 90% (MIC 90%) of the seven antimicrobial drugs assayed against Gram negative rods isolated from urinary infections, blood and secretion and faeces. The new cephalosporins, ceftriaxone and RO 19 showed a smaller MIC 90% in all type of cultures.

Table 4 enhanced a MIC 90% of all tested antimicrobial drugs against 100 Gram negative rods.

Table 5 shows the MIC 90% of all antimicrobial drugs assayed against the Enterobacteria and *Pseudomonas* spp.

**Table 1** - Distribution of number and percentage of 100 Gram negative rods strains isolated from nosocomial patients.

| Strains                 | Number | %     |
|-------------------------|--------|-------|
| <i>E. coli</i>          | 42     | 42.0  |
| <i>Klebsiella</i> spp   | 11     | 11.0  |
| <i>P. mirabilis</i>     | 10     | 10.0  |
| <i>Enterobacter</i> spp | 8      | 8.0   |
| <i>Shigella</i> spp     | 6      | 6.0   |
| <i>Pseudomonas</i> spp  | 6      | 6.0   |
| <i>Serratia</i> spp     | 4      | 4.0   |
| <i>M. morganii</i>      | 4      | 4.0   |
| <i>P. vulgaris</i>      | 4      | 4.0   |
| <i>Salmonella</i> spp   | 2      | 2.0   |
| <i>Citrobacter</i> spp  | 2      | 2.0   |
| <i>Providencia</i> spp  | 1      | 1.0   |
| Total                   | 100    | 100.0 |

**Table 2** - Number and percentage of strains isolated from urinary infections, blood and secretions and faeces.

| Strains                 | Urinary infections |       | Blood and secretions |       | Faeces |       |
|-------------------------|--------------------|-------|----------------------|-------|--------|-------|
|                         | Number             | %     | Number               | %     | Number | %     |
| <i>E. coli</i>          | 28                 | 53.9  | 05                   | 16.2  | -      | -     |
| <i>P. mirabilis</i>     | 08                 | 15.4  | 02                   | 6.4   | -      | -     |
| <i>Klebsiella</i> spp   | 04                 | 7.8   | 07                   | 22.6  | -      | -     |
| <i>P. vulgaris</i>      | 03                 | 5.8   | 01                   | 3.2   | -      | -     |
| <i>M. morganii</i>      | 02                 | 3.8   | 02                   | 6.4   | -      | -     |
| <i>Enterobacter</i> spp | 02                 | 3.8   | 06                   | 19.4  | -      | -     |
| <i>Pseudomonas</i> spp  | 02                 | 3.8   | 04                   | 12.9  | -      | -     |
| <i>Serratia</i> spp     | 01                 | 1.9   | 03                   | 9.7   | -      | -     |
| <i>Citrobacter</i> spp  | 01                 | 1.9   | 01                   | 3.2   | -      | -     |
| <i>Providencia</i> spp  | 01                 | 1.9   | -                    | -     | -      | -     |
| <i>E. coli</i> 0125:K70 | -                  | -     | -                    | -     | 05     | 29.4  |
| <i>S. flexneri</i>      | -                  | -     | -                    | -     | 03     | 17.7  |
| <i>S. sonnei</i>        | -                  | -     | -                    | -     | 03     | 17.7  |
| <i>Salmonella</i> spp   | -                  | -     | -                    | -     | 02     | 11.7  |
| <i>E. coli</i> 026:K60  | -                  | -     | -                    | -     | 02     | 11.7  |
| <i>E. coli</i> 0127:K63 | -                  | -     | -                    | -     | 01     | 5.9   |
| <i>E. coli</i> 0119:K69 | -                  | -     | -                    | -     | 01     | 5.9   |
| Total                   | 52                 | 100.0 | 31                   | 100.0 | 17     | 100.0 |

**Table 3** - Minimum inhibitory concentration of seven antimicrobial drugs able to inhibit 90% of Gram negative rods strains isolated from urinary infections, blood and secretions and faeces.

| Drugs         | Urinary infections | Blood and secretions | Faeces           |
|---------------|--------------------|----------------------|------------------|
|               | MIC 90%<br>ug/ml   | MIC 90%<br>ug/ml     | MIC 90%<br>ug/ml |
| RO 19-5248    | 0.4                | 10.4                 | 0.4              |
| Cephalexin    | >128.0             | >128.0               | >128.0           |
| Anoxacillin   | >128.0             | >128.0               | >128.0           |
| Ceftriaxone   | 0.1                | 10.4                 | 2.6              |
| Cefoxitin     | 51.2               | 128.0                | 3.7              |
| Ampicillin    | >128.0             | >128.0               | >128.0           |
| Cotrimoxazole | >128.0             | >128.0               | >128.0           |

**Table 4** - Minimum inhibitory concentration of seven antimicrobial drugs able to inhibit 90% of 100 Gram negative rods strains.

| Drugs         | MIC 90%<br>(ug/ml) |
|---------------|--------------------|
| RO 19-5248    | 2.0                |
| Cefalexin     | >128.0             |
| Amoxacillin   | >128.0             |
| Ceftriaxone   | 1.0                |
| Cefoxitin     | 59.4               |
| Ampicillin    | >128.0             |
| Cotrimoxazole | >128.0             |

## Discussion

The behaviour of bacteria isolated from different types of infections showed "in vitro" resistance patterns to beta-lactams and bacteriostatic drugs similar to other authors (3, 4, 9, 10).

The new cephalosporins revealed a most effective action on bacteria isolated from urinary infections. Thus, the laboratorial findings suggest that the low levels of MIC 90% of two cephalosporins is due to the non use of these drugs in our hospital environment (1, 3, 10, 13).

**Table 5** - Distribution of the MIC 90% of seven antimicrobial drugs tested against Enterobacteria and *Pseudomonas* spp isolated from nosocomial patients.

| Drugs         | Enterobacteria<br>(ug/ml) | <i>Pseudomonas</i> spp<br>(ug/ml) |
|---------------|---------------------------|-----------------------------------|
| RO 19-5248    | 0.57                      | 128.0                             |
| Cephalexin    | >128.0                    | >128.0                            |
| Anoxacillin   | >128.0                    | >128.0                            |
| Ceftriaxone   | 0.12                      | 25.6                              |
| Cefoxitin     | 38.4                      | >128.0                            |
| Ampicillin    | >128.0                    | >128.0                            |
| Cotrimoxazole | >128.0                    | >128.0                            |

The MIC 90% of seven antimicrobial drugs tested against strains isolated from urinary infections, blood and secretions, and faeces exhibited similar results to other papers (3, 4, 9).

The strains that the MIC 90% represent high levels to beta-lactams (cephalexin, amoxacillin and ampicillin) and cotrimoxazole probably due to the use of these drugs in our hospital (1, 3, 10). However, the first generation cephalosporins and ampicillin has been always used. The second generation cephalosporins (cefoxitin) has showed effectiveness in MIC 90% but limitation of its usage has been found on its high cost. The third generation cephalosporins (RO 19 and ceftriaxone) show a structure with stable beta-lactam chains and has shown a better clinical and microbiological results (4, 9, 12). Furthermore, the newest cephalosporins exhibits a excellent action on bacteria isolated from urinary infections and worse on strains isolated from other materials. These cephalosporins have shown adequate indication for Gram negative genito-urinary infections because its active action in the urinary flow (9).

The MIC 90% of all seven antimicrobial drugs disclosed lower results for RO 19 and ceftriaxone because the absence of its selective pressure. Otherwise, the MIC 90% of two new cephalosporins in Enterobacteria was smaller while has been found higher in *Pseudomonas* spp. Under these circumstances, we concluded that Enterobacteria isolated from our patients has shown resistance factors to the other five drugs which is in agreement with other reports (1, 2, 3, 10). Some features were observed to *Pseudomonas* spp which all were found to beta-lactamases producers as observed by other authors (4, 8, 9, 13).

### **Conclusions**

1. Ceftriaxone and RO 19 showed an excellent antimicrobial action "in vitro" against Gram negative rods.
2. The new cephalosporins are the best therapy able to act in urinary infections by Gram negative rods.
3. The Enterobacteria showed high sensibility to RO 19 and ceftriaxone while *Pseudomonas* spp exhibited resistance to all drugs.

### **References**

1. Campos, C.E.O.P.; Decarlis, R.M.S.T. & Campos, E.P. - Aspectos microbiológicos de bactérias isoladas de pacientes com infecções pulmonares agudas tratadas pela Tobramicina. Rev. Microbiol. (São Paulo), 14:176-182, 1983.
2. Campos, E.P. & Campos, C.E.O.P. - Tratamento de pneumonias bacterianas com um novo antibiótico, cefamandole. Folha Médica (BR), 83:876-80, 1982.
3. Campos, E.P.; Azevedo, J.L. & Campos, C.E.O.P. - Modelos de resistência a drogas de bactérias isoladas de infecções pulmonares agudas. Folha Médica (BR), 88:155-160, 1984.
4. Cleeland, R. & Squires, E. - Antimicrobial activity of ceftriaxone. A. Review Am. J. Med., 77:3-11, 1984.
5. Cowan, S.T. & Steel, K.L. - Manual of the identification medical bacteria. 2ed. Cambridge University, 1974.
6. Edwards, O.L. & Ewing, N.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3nd. Minneapolis, Burgess Publishing, 1972.
7. Montelli, A.C.; Sadatsune, T. & Decarlis, R.M.S.T. - Comparação da atividade de aminoglicosídeos e de outros antimicrobianos frente a amostras bacterianas isoladas de material clínico. XXII Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2 a 7 de março de 1986, Belo Horizonte, M.G.
8. Pennington, J.E. - Nosocomial respiratory infection. In: Mandell, G.L.; Douglas, Jr., R.G. & Bennett, J.E. - Principles and practice of infectious disease., New York, John Wiley & Sons, cap. 263, p.1620-1624, 1985.
9. Proceedings of a Symposium Ceftriaxone: A long acting cephalosporin. Am. J. Med., 77:1-118, 1984.

10. Rocha, O.M.; Campos, E.P.; Meira, D.A.; Brasil, M.A.M.; Mendes, R.P. & Campos, C.E.O.P. - Uso de antimicrobianos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. *Rev. Inst. Med. Trop.*, (São Paulo), 22:89-92, 1980.
11. Trabulsi, L.R.; Almeida, N.P.S. & Marques, L.R.M. - Inhibitory concentrations of cefoperazone, cefazolin, cefamandole, cephalosporine and cefoxitin for 300 Gram negative clinical isolates. *Clin. Ther.*, 3:145-148, 1980.
12. Trabulsi, L.R.; Silva, N.P. & Marques, L.R.M. - Atividade comparada da cefoperazona e cinco cefalosporinas frente a 628 amostras de Enterobactérias, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. *Rev. Microbiol.* (S.Paulo), 13:297-300, 1982.
13. Wenzel, R.P. & Thompson, R.C. - Nosocomial infection. In: Mandell, G.L.; Douglas, Jr., R.G. & Bennett, J.E. - Principles and practice of infectious diseases. 2ed. New York, John Wiley & Sons, cap. 264, p. 1625-1626, 1985.

## AVALIAÇÃO DE UM TESTE RÁPIDO DE AGLUTINAÇÃO EM LÂMINA PARA IDENTIFICAÇÃO DE CULTURAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLADAS DE ALIMENTOS

Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco  
 & Eneida Maria Fontinelle Nielsen

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

### **Resumo**

Fez-se uma avaliação do teste rápido de aglutinação em lâmina (Staphy-Test, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.), para identificação de culturas de *Staphylococcus aureus* isoladas de alimentos, comparando-o com o teste da coagulase em tubo. 485 colônias isoladas em agar Baird-Parker provenientes de diversos tipos de alimentos, foram submetidas simultaneamente aos dois testes, verificando-se 99,2% de correlação entre eles. A sensibilidade do Staphy-test foi 98,8% e a especificidade, 100%.

### **Summary**

*Evaluation of a rapid slide agglutination test for the identification of Staphylococcus aureus isolated from foods*

A rapid slide agglutination test (Staphy-Test, Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.) was compared with the tube coagulase test for the identification of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. A total of 485 colonies isolated from several foods by direct plating on Baird Parker Agar were submitted to both tests, with 99,2% of correlation between them. Staphy-Test showed 98,8% of sensibility and 100% os specificity.

O procedimento rotineiro para identificação de *Staphylococcus aureus* em alimentos, compreende o isolamento de colônias em agar seletivo e posterior identificação das colônias suspeitas através dos testes de coagulase, DNase ou termonuclease. Resultados definitivos só são disponíveis 24 a 48h após o isolamento das colônias. Recentemente, foram descritos testes rápidos para a identificação deste microrganismo, baseados na aglutinação de hemácias ou de partículas de látex sensibilizadas (Corret, G. & col., Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A249, p.32-38, 1981; Essers, L. & Rodebold, K., J. Clin. Microbiol., 12:641-643, 1980). Atualmente estes testes vem sendo largamente utilizados no exterior, devido à facilidade de execução e rapidez na obtenção de resultados. Vários "kits" comerciais são fabricados tanto nos Estados Unidos quanto em diversos países europeus (Berke, A. & Tilton R., J. Clin. Microbiol., 23:916-919, 1986).

No Brasil, foi recentemente introduzido um reativo denominado Staphy-Test (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda.), que se baseia na capacidade do *S. aureus* aglutinar hemácias de carneiro préviamente sensibilizadas com fibrinogênio. O Staphy-Test compreende dois reativos: Staphy-Test R e Staphy-Test C. O primeiro é o reativo propriamente dito, uma vez que contém hemácias sensibilizadas e o segundo é o reativo controle, que contém hemácias idênticas às do primeiro reativo, porém não sensibilizadas. Este último reativo destina-se à exclusão de aglutinações inespecíficas, que são bastante raras, mas podem ocorrer.

O objetivo desta pesquisa foi detectar o grau de correlação existente entre o teste rápido de aglutinação em lâmina (Staphy-Test) e os testes convencionais empregados na identificação de culturas de *S. aureus* isoladas de diversos tipos de alimentos.

O estudo foi desenvolvido com 57 amostras de alimentos assim distribuídos: 12 produtos cárneos crus, 21 produtos cárneos cozidos, dez produtos cárneos salgados, dez queijos e quatro doces cremosos. Cada alimento foi triturado em liquidificador estéril com água tamponada esterilizada, na proporção de 1:10. Semeou-se 0,1ml desta mistura em superfície de agar Baird-Parker suplementado com emulsão de gema de ovo. Após incubação a 35°C durante 48h, colônias típicas de *S. aureus* (negras, com ou sem halos de lecitinase e de lipólise), bem como colônias não típicas foram submetidas ao teste da coagulase em tubo e ao teste da aglutinação em lâmina (Staphy-Test), em um total de 485 colônias. Quando as colônias a serem testadas eram pequenas, procedeu-se à uma repicagem em agar nutritivo inclinado com incubação de 24h a 35°C, antes da execução dos testes. O teste da coagulase em tubo foi realizado cultivando-se as colônias suspeitas em caldo infusão de cérebro e coração por 24h a 35°C, misturando-se em seguida 0,25ml deste caldo a 0,5ml de plasma de coelho citratado diluído 1:5. Após agitação, os tubos foram incubados em banho-maria a 37°C, observando-se periodicamente a coagulação do plasma, até 24h. O teste da aglutinação em lâmina foi realizado depositando-se separadamente sobre uma lâmina de vidro uma gota do reativo-teste (Staphy-Test R) e uma gota do reativo-controle (Staphy-Test C), e homogeneizando em cada uma destas gotas uma parte da colônia a ser testada, com o auxílio de um palito estéril. O teste é considerado positivo quando ocorre aglutinação das hemácias do reativo-teste em cinco a dez segundos, o mesmo não ocorrendo com o reativo-controle.

Colônias com resultados conflitantes, ou com testes de interpretação duvidosa, foram submetidas ao teste da termonuclease. Para este teste, as culturas em caldo infusão de cérebro e coração foram fervidas por 15 min, e em seguida, transferidas para os orifícios feitos em lâminas de microscópio recobertas de agar DNA-azul de toluidina. Após incubação em câmara úmida por 4h a 35°C, observou-se a formação de halos de coloração roxa em volta dos orifícios. Em todos os testes, foram utilizados controles positivos e negativos apropriados.

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1. Verificou-se que 98,8% das colônias coagulase positivas foram também positivas no Staphy-Test, indicando a alta sensibilidade deste teste. A ausência de resultados falso-positivos com o Staphy-Test confere 100% de especificidade ao teste. Valores desta ordem não foram detectados por outros autores em nenhum dos "kits" estrangeiros estudados (Berke, A. & Tilton, R., J. Clin. Microbiol., 23: 916-919, 1986).

Entre as 485 colônias testadas, verificou-se que quatro das colônias coagulase positivas não foram positivas no Staphy-Test, tendo sido positivas também no teste da termonuclease. Não se observou nenhuma colônia Staphy-Test positiva entre as colônias coagulase negativas. Estes resultados indicam que a correlação entre os dois testes é 99,2%.

As vantagens do teste de aglutinação em lâmina em relação aos testes convencionais são inúmeras. Trata-se de um teste simples, que dispensa a necessidade de cultivar a colônia em exame, em caldo, o que implica em menos tempo e trabalho para obtenção de resultados. A leitura dos resultados é imediata e inequívoca, o que não é possível em nenhum dos testes clássicos. Além disso, não há necessidade do emprego de culturas controles, indispensáveis nos testes de coagulase e termonuclease. A estabilidade dos reagentes é bastante grande, uma vez que se mantém ativos por até seis meses, se conservados em geladeira. Inegavelmente, a principal vantagem é a simplificação do trabalho laboratorial, particularmente na análise de alimentos, nos quais a quantificação de *S. aureus* é tarefa de rotina.

Tabela 1 - Comparação entre o teste da coagulase em tubo e o Staphy-Test

**Símbolos:** a: colônias negativas no teste da coagulase em tubo, isoladas no agar Baird-Parker.

| Culturas         | Culturas positivas no Staphy-Test |     |      |
|------------------|-----------------------------------|-----|------|
|                  | Nº                                | Nº  | %    |
| <i>S. aureus</i> | 329                               | 325 | 98,8 |
| Outras bactérias | 156                               | 0   | 0,0  |

Além disso, não há necessidade do emprego de culturas controles, indispensáveis nos testes de coagulase e termonuclease. A estabilidade dos reagentes é bastante grande, uma vez que se mantém ativos por até seis meses, se conservados em geladeira. Inegavelmente, a principal vantagem é a simplificação do trabalho laboratorial, particularmente na análise de alimentos, nos quais a quantificação de *S. aureus* é tarefa de rotina.

## ISOLAMENTO DE SALMONELLA NO AMBIENTE AQUÁTICO: SIGNIFICADO SANITÁRIO

Maria Therezinha Martins  
Gil Vital Alvares Pessoa

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

Petra S. Sanchez  
Maria Inês Z. Sato  
Cátia K. Monteiro  
Carlos A. Coimbrão  
Elizabeth Marques

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental  
Av. Prof. Frederico Hermann Jr, 345  
05459 São Paulo SP, Brasil

& Kinue Irino

Instituto Adolfo Lutz  
Av. Dr. Arnaldo, 355  
05329 São Paulo SP, Brasil

### Resumo

Para avaliar o significado sanitário de *Salmonella* em águas foram examinadas 894 amostras de águas de esgotos, salgadas e doces, sendo obtidos 5.430 isolamentos de *Salmonella*. Constatou-se que, nos esgotos os sorogrupos e sorotipos de *Salmonella*, com exceção de *S. agona*, apresentaram padrão de distribuição similar ao obtido em coproculturas. Nos esgotos provenientes de hospitais predominou *S. typhimurium* var. 0:5- que também foi o mais frequentemente isolado de coproculturas. Foi observado que nos mananciais e praias mais poluídos, prevaleciam os sorogrupos e sorotipos mais comuns de esgotos, e o contrário ocorreu em amostras de locais menos poluídos. Não foi obtida correlação estatística entre NMP/100 mL de salmonelas e NMP/100 mL de coliformes em esgoto, no entanto, quando se relacionou graficamente, níveis de coliformes e porcentagem de isolamento de salmonelas em águas doces e salgadas, obteve-se uma relação praticamente linear.

### Summary

*Isolation of Salmonella from aquatic environment: Sanitary significance*

To evaluate the sanitary significance of *Salmonella* in water, a total of 894 samples of sewage, saltwaters and freshwaters were examined, 5430 strains of *Salmonella* were isolated.

The distribution pattern of *Salmonella* serotypes in sewage, with the exception of *S. agona* was similar to that obtained in fecal specimens. In sewage samples collected near hospitals *S. typhimurium* var. 0:5-

Rev. Microbiol., São Paulo, 19(1):29-39, Jan./Mar. 1988.

*typhimurium* var. 05:- was prevalent and this also occurred in stools. It was noted that in the most polluted water sources and beaches *Salmonella* serogroups and serovars were those prevalent in sewage and this did not occur in the less polluted salt and fresh waters. The statistical correlation between MPN/100 mL of *Salmonella* and MPN/100 mL of coliforms was not obtained, but when coliform levels and percentage of *salmonellae* isolation were plotted in prob-log graphic it was obtained a nearly linear relation.

## Introdução

O controle da qualidade da água, do ponto de vista bacteriológico é ainda, na maioria dos países, fundamentado nos parâmetros relativos a coliformes totais e coliformes fecais.

Nos anos recentes têm havido contróverias sobre o significado do grupo coliforme como indicador de poluição de origem fecal, devido a vários relatos sobre surtos de veiculação hídrica, principalmente de salmoneloses, em comunidades onde a água era considerada adequadamente protegida, pois, com base nos resultados de análises convencionais, atendiam aos padrões para coliformes (8, 9).

Um dos principais surtos de salmonelose em humanos, citado na literatura nos últimos anos, ocorreu em Riverside, California, em 1965. Com base em estudos epidemiológicos e análises bacteriológicas constatou-se ser a água o veículo de *Salmonella typhimurium* que foi isolada de seis amostras de água e pertencia ao mesmo fagótipo da isolada de casos clínicos. Um total de 16.000 pessoas foram atingidas. Os testes para detecção de coliformes realizados antes e durante a epidemia não demonstraram evidências de contaminação (3, 17).

O isolamento de patógenos de amostras de água é dependente do tipo e grau de tratamento sofrido pelos esgotos, da capacidade de resistência dos organismos às ações de antibiose, predição e contaminação química, das condições sócio-econômicas e dos hábitos alimentares da comunidade e, principalmente, das condições epidemiológicas da população humana e animal. Consequentemente, a introdução de patógenos via excretas na água ou no solo é intermitente (4, 5).

Há necessidade de informações sobre a prevalência na água ou em outras amostras ambientais, de microrganismos patogênicos, relacionando-os com níveis de indicadores de contaminação (5, 13, 15). O isolamento de organismos patogênicos principalmente *Salmonella* em conjunto com organismos coliformes enfatiza a importância destes últimos como indicadores de contaminação de origem fecal e dos riscos à saúde (39).

A detecção da salmonelas de amostras ambientais passou a ser obtida com maior facilidade com a introdução de técnicas de temperatura elevada que possibilitaram um melhor isolamento destes microrganismos (39).

A extrema resistência de bactérias do gênero *Salmonella* aos fatores ambientais justifica também a utilização deste parâmetro em estudos que visem avaliar a eficácia dos processos de tratamento de águas, águas residuárias (23, 26, 28, 29) e lodos de esgoto (11); a eficiência dos processos naturais de auto-depuração; a qualidade de águas utilizadas na aquicultura, recreação (15, 27, 36, 40), outros usos da água e, ainda, em estudos epidemiológicos (20, 21, 30, 31, 37, 38).

A finalidade deste estudo foi avaliar a qualidade de águas doces e salgadas comparando a frequência de isolamento de *Salmonella*, (sorogrupos e sorotipos) e os níveis de coliformes, visando obter informações sobre a relação entre indicadores e estes patógenos e o seu significado sanitário.

## Material e Métodos

### Amostragem

Água salgada - foram selecionadas com base em dados prévios, quatro praias, sendo duas extremamente poluídas (Santos e São Vicente), uma medianamente poluída

(Guarujá) e outra, de boa qualidade (Bertioga). O período de estudo foi de três anos e dois meses, sendo examinadas um total de 412 amostras. As colheitas das amostras foram realizadas em condições de préamar, pois foi constatado que nesta fase a água apresenta pior qualidade. O técnico responsável pela colheita entrava no mar até à isóbata de um metro e recolhia as amostras em frascos estéreis, mergulhando os mesmos, contra a corrente e a 30 cm da superfície da água. Os frascos eram identificados e armazenados em recipiente com gelo. As análises foram efetuadas em período não superior a 8 horas, decorrido entre a amostragem até à entrega no laboratório.

Água doce - foram colhidas amostras nos principais mananciais que abastecem a Grande São Paulo. As amostras eram procedentes dos afluentes e dos efluentes das estações de tratamento de águas. A metodologia de colheita foi a proposta pelos Standard Methods 14<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup> ed. (1, 2). Foram colhidas e analisadas 214 amostras de água "in natura" e 226 amostras de água tratada, durante um período de dois anos.

Esgotos - trinta e nove amostras de esgotos da cidade de São Paulo e 3 amostras de esgotos da cidade de Santos foram analisadas. As amostras de São Paulo eram provenientes de pontos de amostragem próximos a hospitais, aeroportos, estações rodoviárias, estações ferroviárias, e ainda, de estações elevatórias de esgotos e dos afluentes de estações de tratamento de esgotos. Para colheita das amostras, foram utilizadas latas estéreis presas a cordéis e o material obtido era vertido imediatamente nos fracos de coleta de amostra. Os frascos eram armazenados em recipientes com gelo e transportados para o laboratório sendo que as análises foram realizadas dentro de no máximo 8 horas decorridas desde a colheita até o início do exame.

#### *Procedimento analítico*

Colimetria - a determinação de coliformes totais e fecais em águas e esgotos foi realizada pela técnica de tubos múltiplos, segundo Standard Method 14<sup>a</sup> e 15<sup>a</sup>. (1, 2).

Determinação de *Salmonella* - em águas doces e salgadas foi utilizado o método semi-quantitativo segundo Norma CETESB L5.218 (6). As amostras foram filtradas sob pressão através de membranas filtrantes de éster de celulose de 142 mm de diâmetro e de 0,45 µm de porosidade. Volumes de 250 mL, 2,5 L, 3,0 L ou 5,0 L foram filtrados, dependendo do tipo da água examinada. As membranas foram divididas ao meio e cada uma das metades colocadas num meio de enriquecimento. Uma das metades foi incubada em caldo selenito novobiocina (Difco) (33) à temperatura de 42,5°C durante 24, 48 e 120 h e a outra metade, em meio Rappaport modificado por Hofer (22) e incubada a 37°C durante 24-48 h. Para o isolamento utilizou-se agar xilose lisina desoxicolato (Difco), agar verde-brilhante (Difco), agar sulfito de bismuto (Difco) e agar MacConkey (Difco). Os meios seletivos foram incubados a 37°C durante 24 horas. De cada placa selecionou-se 5 colônias típicas, que foram repicadas para o meio IAL, segundo Pessoa & Silva (34). As culturas com resultados positivos presuntivos foram transferidas para agar conservação e posteriormente submetidas à provas de aglutinação frente a anti-soros polivalentes "O" e "H". As culturas com provas de aglutinação positivas foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz para confirmação e sorotipagem. Em esgotos a determinação de *Salmonella* foi realizada através da técnica dos tubos múltiplos. Foram inoculadas séries de 3 tubos com diluições decimais da amostra e, em paralelo, foram feitas determinações com os dois meios de enriquecimento acima propostos. Toda a sequência da determinação de *Salmonella* foi obedecida, porém as provas foram realizadas para cada tubo onde houve crescimento após cada um dos períodos de incubação estipulados no teste semi-quantitativo. Para os cálculos do NMP/100 mL considerou-se os tubos de cada meio de enriquecimento, separadamente, nos quais se havia obtido positividade para *Salmonella*.

## Resultados e Discussão

### *Salmonella* em Esgotos

Um dos recursos para se conhecer a prevalência de sorotipos de *Salmonella* em uma região é a análise dos esgotos desta comunidade. Este fato já foi confirmado por vários autores (10, 12, 14, 18, 20, 22, 30, 37, 38).

Quanto à frequência de sorogrupos e sorotipos de *Salmonella* em esgotos verificou-se que, nos esgotos de São Paulo entre as 1545 amostras de *Salmonella* obtidas, 47,9% eram do sorogrupo B, 6,1% do sorogrupo C1, 1,6% do sorogrupo C2, 10,7% do sorogrupo C4, 6% do sorogrupo D1, 13,3% do sorogrupo E1, 7,7% do sorogrupo L, 0,1% do sorogrupo Y e 6,5% não foram identificados. Entre os sorotipos obteve-se, do grupo B: *S. agona* (17,4%), *S. typhimurium* var. 0:5-(14,6%), *S. typhimurium* (0,6%), *S. typhimurium* var. 0:5- lac<sup>+</sup> (0,1%), *S. derby* (7,8%), *S. breneney* (2,4%), *S. paratyphi* B (1,4%), *S. reading* (0,3%), *S. saint-paul* (0,2%), *S. brandenburg* (0,1%); do grupo C1: *S. infantis* (2,8%), *S. inganda* (1,5%), *S. oranienburg* (1,3%), *S. tennessee* (0,4%); do grupo C2: *S. newport* (1,6%); do grupo C4: *S. infantis* 0:14+ (10,7%); do grupo D1: *S. panama* (4,4%), *S. enteritidis* (0,8%), *S. javiana* (0,8%); do grupo E1: *S. anatum* (11,7%), *S. butantan* (1,5%); do grupo L: *S. minnesota* (7,7%), do grupo Y: *Salmonella* sp.

Nos esgotos de Santos, entre as 215 amostras de *Salmonella* isoladas, foram obtidas 74,4% do grupo B, 12,5% do grupo C1, 4,2% do grupo C2, os grupos C3 e C4 ocorreram na porcentagem de 0,9%, grupo D1 (1,4%), grupo E1 (2,8%), grupo E4 (0,5%), grupo G2 (1,9%). Entre os sorotipos obteve-se *S. agona* (63,7%), *S. typhimurium* var. 0:5- (3,7%), *S. typhimurium* (1,9%), *S. derby* (5,1%), *S. oranienburg* (12,5%), *S. bovis-morbificans* (3,2%), *S. muenchen* (0,9%), *S. haardt* (0,9%), *S. javiana* (1,4%), *S. anatum* (2,8%), *S. senftenberg* (0,5%), *S. havana* (1,4%) e 1,9% não foram identificados.

Houve predominância dos grupos B, E1, C4 e L, nos esgotos de São Paulo e B, C1, C2 e E1 nos esgotos de Santos. É importante lembrar que as salmonelas prevalentes na população humana e animal, situam-se nos grupos B e E, portanto o esgoto reflete esta contribuição.

Os dez sorotipos que apresentaram maior frequência nos esgotos de São Paulo foram: *S. agona*, *S. typhimurium* var. 0:5-, *S. anatum*, *S. infantis* 0:14+, *S. derby*, *S. minnesota*, *S. panama*, *S. infantis*, *S. breneney* e *S. newport*. A *S. agona* também predominou nos esgotos de Santos. Os dados citados na literatura mostram diferenças entre estes achados e os de outros pesquisadores, demonstrando que a predominância dos sorotipos num esgoto é dependente das características de cada região.

Em uma análise global de vários trabalhos destaca-se que os 10 sorotipos mais frequentemente relatados foram: *S. typhimurium*, *S. derby*, *S. paratyphi* B, *S. infantis*, *S. newport*, *S. montevideo*, *S. give*, *S. breneney*, *S. thompson*, *S. panama* (10, 12, 14, 20, 22, 23, 25, 26, 28, 29, 32). Comparando-se tais resultados, verifica-se que 5 dos sorotipos prevalentes nos esgotos aqui estudados estão entre os 10 mais citados na literatura consultada.

*S. agona* que predominou nos esgotos de São Paulo e de Santos foi citada com menor frequência na literatura. Assim, Ferreira (12) em Minas Gerais, Brasil, refere-se também ao sorotipo como um dos prevalentes no material examinado. Este sorotipo era considerado raro antes de 1968 e passou a ocupar, já em 1973 o 7º lugar entre os isolados de material humano submetido para análise no Center for Disease Control (C.D.C.). Clark & col. (7) associaram-no à farinha de peixe utilizada para rações animais, os quais poderiam servir como fonte de infecção para o homem.

Quando comparamos nossos dados com os obtidos em coproculturas no mesmo período, por Pessoa & col. (35) verificamos que, com exceção de *S. agona* e *S. typhimurium* var. 0:5-, predominantes em esgotos e coproculturas respectivamente, houve uma similaridade quanto aos demais sorotipos. Hofer & Costa (22) também obtiveram boa semelhança entre os sorotipos isolados de esgotos e os de coproculturas, porém Ojala (32) relata resultados divergentes.

Harvey & Price (20) concluíram em seus estudos que o isolamento de sorotipos de *Salmonella* de esgotos retrata com fidelidade a presença de portadores assintomáticos na comunidade. Todavia, demonstra-se na Tabela 1, que além da presença de portadores assintomáticos também outras situações estão envolvidas,

como por exemplo, nos esgotos de hospitais a predominância de *S. typhimurium* var. 0:5- caracterizada por Pessoa & col. (35) como sorotipo de alta incidência nos casos de infecções hospitalares. Estes resultados enfatizam a importância de *Salmonella* como marcador de determinados esgotos, possibilitando avaliar melhor os riscos à saúde devidos à contaminação de um corpo d'água (10).

#### Razão *Salmonella/coliformes* em esgotos

Desde o clássico trabalho de Kehr & Butterfield (24) e posteriormente, os trabalhos de Geldreich (15, 16) como de outros autores (4, 9, 13, 18, 25), tem-se tentado estabelecer uma relação *Salmonella/coliformes*, visando avaliar o significado sanitário dos coliformes como indicadores, bem como, obter dados para fundamentar os padrões da qualidade da água do ponto de vista do risco das doenças de veiculação hídrica.

Cumpre lembrar que a razão *S. typhi/coliformes* é de maior importância, no entanto, nesta pesquisa *S. typhi* não foi isolada. Várias hipóteses poderão ser formuladas para explicar a não detecção de *S. typhi* em nossas amostras, como por exemplo, sua baixa incidência, menor sobrevivência que outras salmonelas, no meio ambiente, ou a baixa sensibilidade do método utilizado para isolamento de *Salmonella*. No entanto, Sears & col. (37, 38) em pesquisas realizadas em Santiago do Chile, utilizando caldo selenito a 41°C e o isolamento em agar sulfito de bismuto obtiveram incidência elevada desta bactéria em águas de irrigação e em esgotos. Como neste trabalho, também foram utilizados os meios citados por aqueles autores, haveria a mesma chance de isolamento de *S. typhi* o que não ocorreu provavelmente pela menor possibilidade de sua presença nas águas examinadas.

Na Tabela 2 estão os dados por nós obtidos e os citados por outros autores, sendo evidente a disparidade dos resultados obtidos nas diferentes pesquisas.

Quando foi efetuada análise de regressão para verificar se havia correlação estatística entre os índices de *Salmonella* e os índices de coliformes totais e de coliformes fecais em esgotos não foi obtida correlação.

*Salmonella* em Água Doce - Nas águas potáveis provenientes dos efluentes finais nas estações de tratamento, *Salmonella* e coliformes foram ausentes indicando boa qualidade do ponto de vista bacteriológico.

Nas águas "in natura" pode-se verificar, na Tabela 3 que, embora a frequência de isolamento de *Salmonella* não tenha apresentado individualmente, perfeita concordância com a Classe da água, foi possível constatar que, de uma maneira geral, quando as águas da Classe 2 eram protegidas, *Salmonella* estava ausente ou, os sorotipos e sorogrupos encontrados, não eram os mais comumente citados em esgotos. Por outro lado, nas águas das Classes 3 ou 4, ou nas de Classe 2 não protegidas, os sorogrupos e sorotipos coadunaram-se com os mais frequentemente isolados em esgotos.

Tabela 1 - Frequência de sorotipos de *Salmonella* por estação de amostragem em esgotos do Município de São Paulo.

**Símbolos:** (a) E.I. - ETE Ipiranga; E.P.P. - E.E.E. de Ponte Pequena; E.R.S. - Estação Roosevelt; E.P. - ETE Pinheiros; E.J. - ETE Jabaquara; E.R. - Estação Rodoviária; A.C. - Aeroporto de Congonhas (Policia Militar); H.M. - Hospital do Mandaqui; H.T. - Hospital do Tatuapé; H.Z. - Hospital da Zona Norte.

| Sorotipos                                | Estações de (a)<br>Amostragem |        |        |          |      |      |      |      | %              |
|--|-------------------------------|--------|--------|----------|------|------|------|------|----------------|
|  | E.I.                          | E.P.P. | E.R.S. | E.P.     | E.J. | E.R. | A.C. | H.M. |                |
| <b>Grupo B</b>                           |                               |        |        |          |      |      |      |      |                |
| <i>S. agona</i>                          | 27,9                          | 12,2   | 2,5    | 33,3     | 5,7  | 41,7 | -    | -    | 13,1 9,2       |
| <i>S. typhimurium</i> var. 0:5-          | 3,9                           | 11,2   | 1,7    | 6,6      | -    | -    | -    | -    | 86,9 41,5 70,7 |
| <i>S. typhimurium</i>                    | -                             | 0,5    | -      | -        | 5,5  | -    | -    | -    | 4,0            |
| <i>S. typhimurium</i> var. 0:5-Jav-      | -                             | -      | -      | -        | -    | -    | -    | -    | 1,5            |
| <i>S. derby</i>                          | 11,5                          | 12,8   | -      | 3,1 10,5 | 12,5 | -    | -    | -    | 4,6 2,0        |
| <i>S. enteritidis</i>                    | 1,5                           | 11,2   | -      | 3,5 0,3  | 1,4  | -    | -    | -    | -              |
| <i>S. paratyphi</i> B                    | -                             | -      | -      | -        | 6,6  | -    | -    | -    | -              |
| <i>S. reading</i>                        | -                             | 2,6    | -      | -        | -    | -    | -    | -    | -              |
| <i>S. saint-paul</i>                     | 0,9                           | -      | -      | -        | -    | -    | -    | -    | -              |
| <i>S. brandenburg</i>                    | 0,3                           | -      | -      | -        | -    | -    | -    | -    | -              |
| <i>Salmonella</i> sp (agrupado B inóvel) | -                             | -      | -      | -        | 13,8 | -    | -    | -    | -              |
| <b>Grupo C<sub>1</sub></b>               |                               |        |        |          |      |      |      |      |                |
| <i>S. infantis</i>                       | 2,1                           | -      | -      | 6,3 5,3  | -    | 100  | -    | -    | 1,0            |
| <i>S. boydton</i>                        | -                             | -      | -      | 9,4      | -    | -    | -    | -    | -              |
| <i>S. oranienburg</i>                    | -                             | -      | 3,4    | 0,4      | -    | -    | -    | -    | 18,5 4,0       |
| <i>S. cereus</i>                         | -                             | -      | -      | -        | -    | -    | -    | -    | 10,6           |
| <b>Grupo C<sub>2</sub></b>               |                               |        |        |          |      |      |      |      |                |
| <i>S. newport</i>                        | 5,4                           | 2,6    | 0,8    | 0,4      | -    | -    | -    | -    | -              |
| <b>Grupo C<sub>4</sub></b>               |                               |        |        |          |      |      |      |      |                |
| <i>S. infantis</i> 0:14+                 | 1,8                           | 0,5    | 7,6    | 0,4 34,3 | 11,1 | -    | -    | -    | 13,1           |
| <b>Grupo D<sub>1</sub></b>               |                               |        |        |          |      |      |      |      |                |
| <i>S. paratyphi</i>                      | 12,4                          | -      | 7,6    | 6,7      | -    | -    | -    | -    | 1,0            |
| <i>S. enteritidis</i>                    | -                             | -      | -      | 5,1      | -    | -    | -    | -    | -              |
| <i>S. javiana</i>                        | 3,6                           | -      | -      | -        | -    | -    | -    | -    | -              |
| <b>Grupo E<sub>1</sub></b>               |                               |        |        |          |      |      |      |      |                |
| <i>S. mbandaka</i>                       | 22,4                          | 3,2    | 26,3   | 17,2 7,8 | -    | -    | -    | -    | -              |
| <i>S. kutscher</i>                       | -                             | -      | -      | -        | 5,7  | -    | -    | -    | 1,5 4,0        |
| <b>Grupo L</b>                           |                               |        |        |          |      |      |      |      |                |
| <i>S. newport</i>                        | 5,1                           | 9,6    | 29,7   | 0,4 9,9  | 11,1 | -    | -    | -    | 12,3           |
| <i>Salmonella</i> sp (trapa)             | 0,9                           | -      | 0,8    | -        | -    | -    | -    | -    | -              |
| <i>Salmonella</i> sp (trapa)             | -                             | 33,5   | 19,5   | -        | -    | 16,7 | -    | -    | -              |

*Salmonella* em Águas de Praias - Praias de Santos e São Vicente - Foram analisadas 256 amostras de águas de praias de Santos e São Vicente e 74,7% foram positivas para *Salmonella*. Na Tabela 4 observa-se elevados índices de coliformes, que justificaram a classificação das praias como impróprias para o banho. Verifica-se que *Salmonella* do soro grupo B predominou em praticamente todos os locais de amostragem e os sorotipos mais comumente encontrados foram similares com aqueles isolados de esgoto.

Praias de Bertioga - Estas praias apresentam-se como as menos poluídas entre as estudadas. Das 81 amostras 8,6% revelaram a presença de salmonelas (Tabela 5), porém os sorotipos identificados foram prevalentes em esgotos. Isto demonstra a importância da sorotipagem, para melhor interpretação dos resultados.

Praias do Guarujá - Das 66 amostras examinadas 12% foram positivas para *Salmonella* (Tabela 6). Observando os índices de coliformes é possível verificar que essas praias já se apresentam mais poluídas que as de Bertioga, embora não atinjam os valores das Praias de Santos e São Vicente.

Foram encontrados em alguns pontos, grupos sorológicos e sorotipos de salmonelas também relatados em amostras de esgotos, porém não com a mesma frequência e prevalência como na praias de Santos e São Vicente.

#### Relação *Salmonella*/Coliformes em Águas

Para verificar esta relação foram definidas

Tabela 2 - Razão *Salmonella*/coliformes em amostras de esgoto - Comparação com dados da literatura.

Símbolos: a - S: C.T. - *Salmonella*: Coliformes totais; b - S: C.F. - *Salmonella* Coliformes fecais.

| AUTOR(ES)                      | S: C.T. <sup>a</sup>       | S: C.F. <sup>b</sup>       |
|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Kehr & Butterfield (24) (1943) | 1:333.333                  | -                          |
| Grabow (in 16) (1977)          | 1:312.500                  | -                          |
|                                | 1:322.580 <sup>a</sup>     | -                          |
| Headley & col. (21) (1974)     | -                          | 1:500                      |
| Kristensen (25) (1970)         | -                          | 1:10.625 a<br>1:39.500.000 |
| Dutka (9) (1973)               | 1:650 a 1:66.000           | 1:95 a 1:16.000            |
| NÓSSOS DADOS                   | 1:9.333 a<br>1:600.000.000 | 1:1.867 a<br>1:152.173.910 |

Tabela 3 - Comparação entre classes de água doce, médias geométricas de coliformes e porcentagens de isolamento, sorogrupo e sorotipos de *Salmonella*.

Símbolos: (a): classificação das águas interiores (Dec. 8468 de 08/09/76. SP (parâmetros bacteriológicos) classe II: 80% das amostras não devem ultrapassar 1000 C.F. (Coliformes fecais) ou 5.000 C.T. (Coliformes totais); Classe III: 80% das amostras não devem ultrapassar 4.000 C.F. ou 20.000 C.T.; Classe IV: quando os teores de C.F. ou C.T. ultrapassam ; (b) Segundo C.T. seria classificada na classe III; (c): Problemas com "florização" de algas cianofíceas e com a qualidade físico-química da água.

| EXPOSIÇÃO DE<br>TRATAMENTO<br>DE ÁGUA | MÉDIA GEOMÉTRICA ( NMF/100 ml.) |        |        |        | PROTEÇÃO e<br>CLASSE <sup>a</sup>   | % DE ISOLAMENTO<br>de <i>Salmonella</i> | TOPOGRUPOS MAIS<br>FREQUENTES | SOROTIPOS MAIS<br>FREQUENTES   |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------|--------|--------|---|---|-------------------------------|--|
|                                       | 1º Ano                          | 2º Ano | 1º Ano | 2º Ano |   |   |                               |  |
| Casa Grande                           | 540                             | 520    | 62     | 83     | rázavel (dentro da<br>reserva florestal)                                    | 41,7                                    | 41,7                          | <i>C<sub>2</sub>, N, F, B</i><br><i>S. paratyphi, S. enteritidis,<br/>S. typhimurium</i>   |
| Varginha Grande                       | 3100                            | -      | 1000   | -      | não - III   | 60,0                                    | -                             | <i>B, E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub></i><br><i>S. typhimurium var. O:5,<br/>S. enteritidis, S. paratyphi</i>   |
| Teodoro Pires                         | 1300                            | 609    | 61     | 43     | não (exceção despejo<br>dos descharcos e<br>industriais) II, III            | 15,0                                    | 19,0                          | <i>B, C<sub>4</sub>, E<sub>1</sub></i><br><i>S. agona, S. derby,<br/>S. typhimurium var. O:5,<br/>S. enteritidis</i>   |
| Ouricuri                              | 930                             | 460    | 510    | 99     | não (circundância<br>por área urbana)<br>III                                | 16,7                                    | 25,0                          | <i>E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, C<sub>2</sub></i><br><i>S. enteritidis, S. paratyphi,<br/>S. typhimurium</i>  |
| Rio Grande                            | 140                             | 210    | 5      | 8      | rázavel (é amea-<br>çado pelo<br>maior da reserva<br>que é poluída) II, III | 0                                       | 0                             | -  |
| Rebelo<br>Pires                       | 3700                            | 4700   | 870    | 1400   | não (exceção despejo<br>dos descharcos e<br>de tratadouros) III<br>e IV     | 33,3                                    | 66,7                          | <i>C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub>, E<sub>1</sub>, B</i><br><i>S. quinsig, S. infantis,<br/>S. cholerae, S. enteritidis,<br/>S. typhimurium, S. giardii</i>           |
| Alto Cotia                            | 200                             | 150    | 14     | 14     | boa (dentro da re-<br>serva florestal) II                                   | 20,0                                    | 16,7                          | <i>E, 0</i><br><i>S. enteritidis</i>   |
| Baixo Cotia                           | 3500                            | 14000  | 470    | 2200   | não (exceção despejo<br>dos descharcos e<br>de tratadouros) II<br>e IV      | 41,7                                    | 50,0                          | <i>B, C<sub>1</sub>, L, E<sub>1</sub>, C</i><br><i>S. infantis, S. sonnebergi,<br/>S. enteritidis, S. cholerae,<br/>S. typhimurium, S. derby,<br/>S. leicester</i> |
| Quaraí                                | 607                             | 520    | 140    | 83     | Razável (exce-<br>ção contribuintes que<br>atravessam várias<br>cidades)    | 40,0                                    | 25,0                          | <i>C<sub>2</sub>, L, E<sub>1</sub>, C<sub>1</sub></i><br><i>S. quinsig, S. enteritidis,<br/>S. enteritidis, S. infantis</i>  |
| Juraci<br>Cantareira                  | 950                             | -      | 100    | -      | rázavel (na área<br>livre de descharge-<br>mento urbano) II                 | 20,0                                    | -                             | <i>C<sub>2</sub></i><br><i>S. quinsig</i>  |
| Cantareira                            | 150                             | -      | 9      | -      | rázavel (dentro da<br>reserva florestal)<br>II                              | 0                                       | -                             | -  |

faixas para coliformes totais e fecais, relacionando-se os números de amostras analisadas e a porcentagem de isolamento de salmonelas.

Quando os dados foram lançados em papel prob-log (Figuras 1 a 4) foi possível verificar que há uma relação praticamente linear entre os índices de coliformes e as chances de isolamento de *Salmonella*.

Grunnet (18), também encontrou resultados similares, isto é, quando aumenta a densidade de coliformes as chances de isolamento de *Salmonella* também aumentam. O estabelecimento desta relação é uma preocupação dos sanitários principalmente para fundamentar o estabelecimento de critérios ou padrões de qualidade das águas para vários usos, principalmente para fins recreacionais (4, 15, 19, 25, 36).

Observou-se no entanto, que às vezes *Salmonella* não era detectada quando os índices de coliformes eram elevados e, em outras situações, frente a níveis baixos de coliformes, *Salmonella* estava presente. Este fato foi também relatado por outros autores (5, 8, 9, 13).

No estudo de águas de praias foram também examinadas, para isolamento de *Salmonella*, porções de 250 mL com base em uma proposta de Livingstone (27). Neste caso também foi obtida relação entre a frequência de isolamento de salmonelas e densidades de coliformes.

Podemos concluir que entre os patógenos presentes em águas, lodos, resíduos sólidos, salmonelas são os mais frequentemente detectados não apenas devido à sua maior sobrevivência no meio externo, mas também porque os métodos para seu isolamento já estão mais disseminados e adequados. Não se propõe, no entanto, sua inclusão em análises de rotina devido ao custo das análises e à necessidade de pessoal especializado para sua execução. Verificou-se que os coliformes ainda são bons indicadores de poluição, principalmente frente à presença de *Salmonella*, pois

**Tabela 4 - Comparação entre os valores para indicadores de poluição fecal e frequência de isolamento de *Salmonella*, sorogrupos e sorotipos predominantes: Praias de Santos e São Vicente.**

**Símbolo:** a - Praias de Santos: S1 a S13, Praias de São Vicente: I14 a I17 e SV18 a SV20.

| PRAIAS *                  | VALORES MÉDIOS<br>MPN/100 mL<br>C.T.<br>C.F. | % ISOLAMENTO DE<br><i>Salmonella</i><br>250 mL<br>3,0 L | SOROGRUPOS<br>PREDOMINANTES | SOROTIPOS PREDOMINANTES  |
|---------------------------|--|---|-----------------------------|--|
| S1-Ponta da Praia         | 2,3x10 <sup>4</sup> 4,9x10 <sup>3</sup>      | 46,7  | 86,7                        | B, C <sub>1</sub> , L  |
| S2-Praia do Estreito      | 1,7x10 <sup>4</sup> 3,3x10 <sup>3</sup>      | 18,7  | 68,7                        | B, C <sub>1</sub> , C <sub>4</sub> , E <sub>4</sub>                  |
| S3-Praia de Aparecida     | 1,1x10 <sup>4</sup> 2,3x10 <sup>3</sup>      | 20,0  | 60,0                        | B, C <sub>1</sub> , C <sub>4</sub> , D <sub>1</sub>                  |
| S4-Praia de Aparecida     | 2,3x10 <sup>4</sup> 7,9x10 <sup>3</sup>      | 46,7  | 86,7                        | B, C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , L                               |
| S5-Ponta da Praia         | 7,9x10 <sup>3</sup> 3,3x10 <sup>3</sup>      | 31,2  | 93,7                        | B, E <sub>1</sub> , C <sub>3</sub> , C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub> |
| S6-Praia do Estreito      | 2,3x10 <sup>4</sup> 4,9x10 <sup>3</sup>      | 60,0  | 100,0                       | B, C <sub>1</sub>  |
| S7-Praia do Boqueirão     | 1,5x10 <sup>4</sup> 3,3x10 <sup>3</sup>      | 37,5  | 68,7                        | B, C <sub>1</sub> , E <sub>1</sub>                                   |
| S8-Praia do Boqueirão     | 2,3x10 <sup>4</sup> 1,1x10 <sup>4</sup>      | 53,3  | 100,0                       | B, C <sub>2</sub> , L, C <sub>1</sub>                                |
| S9-Praia do Gonzaga       | 2,3x10 <sup>4</sup> 1,3x10 <sup>4</sup>      | 40,0  | 100,0                       | C <sub>2</sub> , E <sub>1</sub> , B                                  |
| S10-Praia do Gonzaga      | 3,3x10 <sup>4</sup> 4,9x10 <sup>3</sup>      | 33,3  | 93,3                        | B, C <sub>1</sub> , E <sub>1</sub> , L                               |
| S11-Praia do José Menino  | 1,3x10 <sup>4</sup> 4,6x10 <sup>3</sup>      | 80,0  | 100,0                       | B, C <sub>1</sub>  |
| S12-Praia do José Menino  | 1,5x10 <sup>4</sup> 4,6x10 <sup>3</sup>      | 37,5  | 68,7                        | C <sub>1</sub> , B, C <sub>2</sub> , L                               |
| S13-Praia do José Menino  | 1,3x10 <sup>4</sup> 4,9x10 <sup>3</sup>      | 26,7  | 86,7                        | B, C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub> , L                               |
| I14-Praia de Itararé      | 3,3x10 <sup>3</sup> 4,9x10 <sup>2</sup>      | 40,0  | 60,0                        | C <sub>4</sub> , C <sub>1</sub>                                      |
| I15-Praia de Itararé      | 2,3x10 <sup>3</sup> 7,0x10 <sup>2</sup>      | 16,7  | 33,3                        | B, C <sub>4</sub> , L, C <sub>2</sub>                                |
| I16-Praia de Itararé      | 4,9x10 <sup>3</sup> 1,3x10 <sup>3</sup>      | 6,7   | 80,0                        | B, C <sub>1</sub>  |
| I17-Praia de Itararé      | 1,3x10 <sup>3</sup> 3,3x10 <sup>2</sup>      | 0   | 60,0                        | B, E <sub>1</sub> , C <sub>2</sub>                                   |
| SV18-Praia de São Vicente | 4,9x10 <sup>3</sup> 1,7x10 <sup>3</sup>      | 26,7  | 73,3                        | B, C <sub>1</sub> , D <sub>1</sub>                                   |
| SV19-Praia de São Vicente | 3,3x10 <sup>4</sup> 3,3x10 <sup>4</sup>      | 60,0  | 100,0                       | B, C <sub>1</sub> , L  |
| SV20-Praia de São Vicente | 1,3x10 <sup>4</sup> 2,5x10 <sup>2</sup>      | 30,8  | 57,7                        | B, C <sub>1</sub> , L, C <sub>4</sub> , C <sub>2</sub>               |

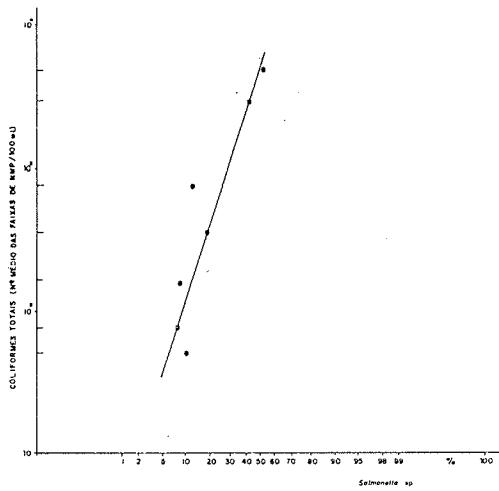
**Tabela 5 - Comparação entre os valores para indicadores de poluição fecal e a frequência de isolamento de *Salmonella*, sorogrupos e sorotipos predominantes: Praias de Bertioga.**

| PRAIAS                   | VALORES MÉDIOS<br>MPN/100 mL<br>C.T.<br>C.F. | % DE ISOLAMENTO DE<br><i>Salmonella</i><br>250 mL<br>3,0 L | SOROGRUP. | SOROTIPOS  |
|--------------------------|--|--|-----------|--|
| E1-Praia da Encosta      | 3,3x10 <sup>2</sup>                          | 79   | 0         | 11,1 C <sub>1</sub> S. infantis  |
| E2-Praia da Encosta      | 1,3x10 <sup>2</sup>                          | 33   | 0         | 11,1 I Salmonella sp   |
| E3-Praia da Encosta      | 2,3x10 <sup>2</sup>                          | 49   | 0         | -  |
| S1-Praia de São Lourenço | 1,7x10 <sup>2</sup>                          | 7  | 0         | 11,1 E <sub>2</sub> S. bungei  |
| S2-Praia de São Lourenço | 70   | 22   | 0         | 11,1 C <sub>1</sub> S. oslo  |
| S6-Praia de Guaratuba    | 22   | 5  | 0         | 11,1 S. paraty   |
| G7-Praia de Guaratuba    | 23   | 2  | 0         | 22,2 B <sub>1</sub> , S <sub>1</sub> , C <sub>1</sub> S. enter, S. sonnei, Salmonella sp |
| G8-Praia de Guaratuba    | 1,7x10 <sup>2</sup>                          | 13   | 0         | -  |
| E9-Praia de Sorocaba     | 17   | 5  | 0         | -  |

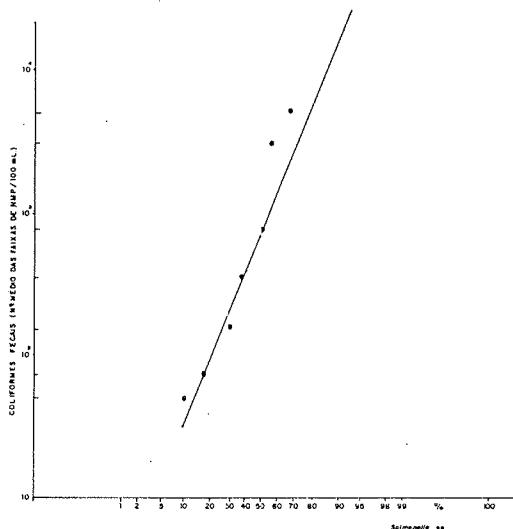
**Tabela 6 - Comparação entre os valores para indicadores de poluição fecal e a frequência de isolamento de *Salmonella*, sorogrupos e sorotipos predominantes: Praias de Guarujá.**

| PRAIAS                         | VALORES MÉDIOS<br>NCF/100 mL<br>C.I.<br>C.I. | % DE ISOLAMENTO DE<br><i>Salmonella</i><br>250 mL<br>S. O L | SOROGRUPO | SOROTIPOS |                       |   |
|--------------------------------|--|---|-----------|-----------|-----------------------|---|
| PC1 - Praia do Perequê         | $7,0 \times 10^2$                            | 1,7x10 <sup>2</sup>   | 0         | 18,2      | E <sub>1</sub> , S    | <i>S. enterica</i> , <i>S. typhimurium</i> var. O:5-  |
| PC2 - Praia de<br>Pettangueiro | $2,3 \times 10^2$                            | 49  | 0         | 9,1       | I                     | <i>S. enterica</i>  |
| ENG - Praia da Enseada         | $2,3 \times 10^2$                            | 33  | 0         | 0         | -                     | -   |
| PC3 - Praia de<br>Pitangueiras | $2,3 \times 10^2$                            | 1,1x10 <sup>2</sup>   | 9,1       | 9,1       | C <sub>1</sub>        | <i>Salmonella</i> sp  |
| GT7 - Praia do Guarujá         | $7,0 \times 10^2$                            | $3,3 \times 10^2$   | 0         | 0         | -                     | -   |
| GAS - Praia Guatubé            | $1,7 \times 10^2$                            | 46  | 0         | 36,4      | B, C <sub>2</sub> , I | <i>S. typhimurium</i> , <i>S. enteritidis</i> ,<br><i>S. enterica</i> , <i>S. typhimurium</i> var. O:5- |

**Figura 1 - Relação entre densidade de coliformes totais e porcentagem de isolamento de *Salmonella* sp em água doce (volume das amostras examinadas: 2,5 L).**

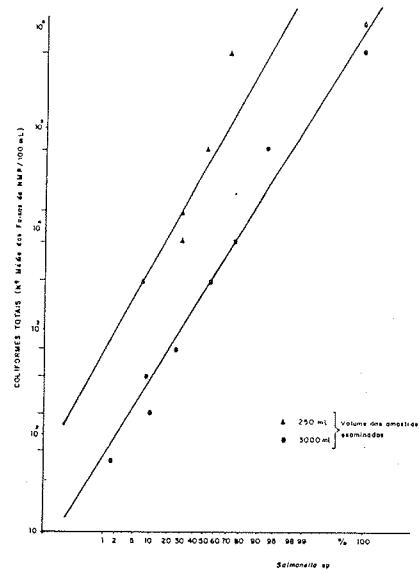


**Figura 2 - Relação entre densidade de coliformes fecais e porcentagem de isolamento de *Salmonella* sp em água doce (volume das amostras examinadas: 2,5 L).**

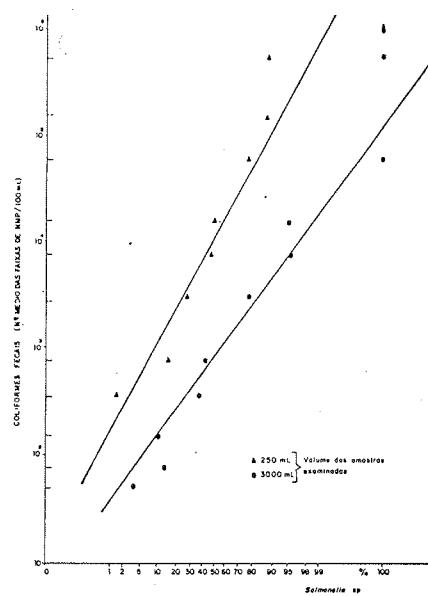


se obtém uma relação praticamente linear entre porcentagem de isolamento de *Salmonella* e níveis de coliformes totais e fecais. Na interpretação de resultados quanto ao isolamento de *Salmonella* de amostras ambientais, a sorotipagem é necessária, pois possibilita confirmação da fonte de poluição. O monitoramento de esgotos visando obter informação sobre os sorotipos de *Salmonella* presentes em uma comunidade é um instrumental importante nos programas de vigilância das salmoneloses. A alta incidência de *Salmonella* em águas da praias indica seu elevado risco à saúde dos usuários.

**Figura 3 – Relação entre densidade de coliformes totais e porcentagem de isolamento de *Salmonella* sp em água salgada.**



**Figura 4 – Relação entre densidade de coliformes fecais e porcentagem de isolamento de *Salmonella* sp em água salgada.**



#### Agradecimentos

À Diretoria da CETESB, pelo apoio na execução do trabalho e aos funcionários da Gerência de Análises Microbiológicas da CETESB pela execução dos serviços técnicos e à Niva D. Celestino pelos serviços datilográficos.

#### Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater, 14. ed. New York, APHA, 1975.
2. American Public Health Association - Standard methods for the examination of water and wastewater. 15. ed. New York, PAHA, 1980.
3. Boring III, J.R.; Martin, W.T. & Elliot, L.M. - Isolation of *Salmonella typhimurium* from municipal water, Riverside, California, 1965. Amer. J. Epidemiol., 93(1):49-54, 1971.
4. Brezenski, F.T. - Estuary water quality and *Salmonella*. In National Specialty Conference on Disinfection, New York, 1970. [Proceedings] New York, Amer. Soc. Civil Eng., 1970 p. 481-514.
5. Brezenski, F.T. & Russomano, R. - The detection and use of *Salmonellae* in studying polluted tidal estuaries. J. Water Pollut. Control Fed., 41:725-737, 1969.
6. CETESB. Isolamento e identificação de *Salmonella* em água e esgoto. Norma CETESB L5.218. São Paulo, 1979.
7. Clark, G.M.; Kauffmann, A.F. & Gangarosa, E.J. - Epidemiology of an international outbreak of *Salmonella agona*. Lancet, 2 (7827):490-493, 1973.
8. Dutka, B.J. - Coliforms are an inadequate index of water quality. J. Environ. Health, 36(1):39-46, 1973.

9. Dutka, B.J. & Bell, J.B. - Isolation of *Salmonella* from moderately polluted waters. *J. Water Pollut. Control Fed.*, 45(2):316-324, 1973.
10. Edel, W.; Van Schothort, M. & Kampelmacher, E.H. - Epidemiological studies on *Salmonella* in a certain area. I. The presence of *Salmonella* in man, pigs, insects, seagulls and in foods and effluents. *Zbl. Bakt. Hyg.*, I. Abt. Orig.A., 235(4):476-484, 1976.
11. Farrah, S. & Bitton, G. - Enteric bacteria in aerobically digested sludge. *Appl. Environm. Microbiol.*, 47(4):831-834, 1984.
12. Ferreira, M.D. - Pesquisa de *Salmonella* em águas superficiais de Belo Horizonte: avaliação das técnicas de colheita e dos meios de enriquecimento e seletivos, Belo Horizonte, s.c.p., 1976 (Tese de mestrado - Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais).
13. Gallagher, T.P. & Spino, D.F. - The significance of numbers of coliform bacteria as an indicator of enteric pathogens. *Water Res.*, 2(2):169-175, 1968.
14. Geldreich, E.E. & VanDonsel, D.J. - *Salmonellae* in freshwater pollution. Apresentado na National Specialty Conference on Disinfection. Amherst, Mass. 1970.
15. Geldreich, E.E. - Applying bacteriological parameters to recreational water quality. *Am. Water Works Assoc.*, 62(1):113-120, 1970.
16. Geldreich, E.E. - Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. In Berg, G., ed. *Indicators of virus in water and foods*, Ann Arbor Science, 1977.
17. Greenberg, A.E. & Ongerth, H.J. - Salmonellosis in Riverside Calif. *J. Am. Water Works Assoc.*, 58:1145-1148, 1966.
18. Grunnet, K. & Nielsen, B.B. - *Salmonella* types isolated from the Gulf of Aarhus compared with types from infected human beings animals and feed products in Denmark. *Appl. Microbiol.*, 18(6):985-990, 1969.
19. Grunnet, K. - *Salmonella* in sewage and receiving waters: assessment of health hazards due to microbially polluted waters. Copenhagen, Aarhus- Odense, 1975. 145 p.
20. Harvey, R.W.S. & Price, T.H. - Sewer and drain swabbing as a means of investigating salmonellosis. *J. Hyg.*, 68(4):611-624, 1970.
21. Hoadley, A.W.; Kemp, A.M.; Firmin, A.C.; Smith, G.T. & Schelhorn, P. - *Salmonellae* in the environment around a chicken processing plant. *Appl. Microbiol.*, 27(5):848-857, 1974.
22. Hofer, E. & Costa, G.A. - Investigação sobre a ocorrência de *Salmonella* em esgotos sanitários da cidade do Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 70(2):221-236, 1972.
23. Kampelmacher, E.H.; Fonds, A.W. & Jansen, L.M.N. - Reduction of *Salmonella*. *E. coli*, coliforms and fecal streptococci by chlorination of sewage treatment plant effluents. *Water Res.*, 11(7):545-550, 1977.
24. Kehr, R.W. & Butterfield, C.T. - Notes on the relation between coliforms and enteric pathogens. *Publ. Health Rep.*, 58(15):589-607, 1943.
25. Kristensen, K.K. - Quantitative examinations of the contents of *Salmonella* in sewage and polluted sea water. *Nord Vet. Med.*, 22(4):201-217, 1970.
26. Leclerc, H.; Catsaras, M.; Savage, C. & Eymard, C. - Sur l'isolément des *Salmonella* dans les milieux fortement pollués. II. Essais sur des eaux résiduaires. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, 21:227-294, 1970.
27. Livingstone, D.J. - An appraisal of sewage pollution along a section of the Natal coast. *J. Hyg.*, 67(2):209-223, 1969.
28. Masson, A. & Chauvin, D. - La recherche des salmonelles dans la station d'épuration des eaux usées de la ville de Lausanne. *Path. Microbiol.*, 40(3/4):147-148, 1974.
29. McCoy, J.H. - *Salmonellae* in crude sewage effluent and sewage polluted natural waters. *Adv. Water Pollut. Res.*, 1:205-243, 1964.
30. Moore, B.; Perry, E.L. & Chard, S.T. - A survey by the sewage swab method of latent enteric infection in an urban area. *J. Hyg.*, 50(2):137-156, 1952.
31. Moore, B. - Sewage contamination of coastal bathing waters, a review. *Bull. Hyg.*, 29(7):689-702, 1954.
32. Ojala, O. - *Salmonella* types in sewage samples in Helsinki. *Nord Vet. Med.*,

- 18(3):146-157, 1966.
33. Pessoa, G.V.A. & Peixoto, E.S. - Caldo selenito - novobiocina; um meio de maior seletividade para o isolamento de *Salmonella* de fezes. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 31:1-3, 1971.
34. Pessoa, G.V.A. & Silva, E.A.M. - Milieu pour l'identification présumptive rapide des enterobactéries, des Aeromonas et des vibrions. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur), 125(A):341-347, 1974.
35. Pessoa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T.; Melles, C.E. & Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo, no septênio 1970-76, I - Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, (38 92):87-105, 1978.
36. Public Health Laboratory Service - Sewage contamination of coastal bathing waters in England and Wales. J. Hyg., 57(4):435-474, 1959.
37. Sears, S.D.; Ferruccio, C.; Levine, M.M.; Cordano, A.M.; Montreal, J.; Black, R.E.; D'Ottone & Rowe, K.N. - Chilean Typhoid Committee - The use of Moore swabs for the isolation of *Salmonella typhi* from irrigation waters in Santiago, Chile. J. Infect. Dis., 149:640-642, 1984.
38. Sears, S.D.; Ferruccio, C. & Levine, M.M. - Sensitivity of Moore sewer swabs for isolating *Salmonella typhi*. Appl. Environ. Microbiol., 51(2):425-426, 1986.
39. Spino, D.F. - Elevated temperature technique for the isolation of *Salmonella* from streams. Appl. Microbiol., 14(4):591-596, 1966.
40. Yoshpe-Purer, Y. & Shuval, H.I. - Salmonellae and bacterial indicator organisms in polluted coastal water and their hygienic significance. In, Ruivo, M., ed. Marine pollution and sea life. London, Fishing News (Books), 1972. p. 574-580.

ELIMINATION OF A STAPHYLOCOCCUS AUREUS PLASMID BY  
8-METHOXYPSORALEN PLUS NEAR UV LIGHT\*

José Pinto de Siqueira Júnior

Dept de Biologia Molecular/CCEN  
Universidade Federal da Paraíba  
58059 João Pessoa PB, Brasil

Manoel Victor Franco Lemos

Dept de Biologia Aplicada à Agropecuária  
FCAV/UNESP  
14870 Jaboticabal SP, Brasil

& João Lúcio de Azevedo

Instituto de Genética/ESALQ  
Universidade de São Paulo  
13400 Piracicaba SP, Brasil

**Summary**

It is shown by using a strain of *Staphylococcus aureus* carrying a plasmid for resistance to tetracycline that 8-methoxysoralen plus near UV light (~365 nm) may eliminate plasmid.

**Resumo**

*Eliminación de um plasmídio de Staphylococcus aureus pela 8-metoxiporaleína associada à luz UV longa*

Em uma linhagem de *Staphylococcus aureus* portadora de um plasmídio para resistência à tetraciclina, mostrou-se que a 8-metoxiporaleína associada à luz UV longa (~365 nm) pode eliminar plasmídio.

The hypothesis that chemical substances which bind to double helical DNA by intercalation will eliminate bacterial plasmids has been proposed (Hahn, F.E. & Ciak, J., Ann. N. Y. Acad. Sci., 182:295, 1971), although substances that act at the biological membrane level may also eliminate plasmids (Sonstein, S.A. & Baldwin, J.N., J. Bacteriol., 111:152, 1972).

Substances in the psoralen group (furocoumarins) in the presence of near UV light (~365 nm, NUV) cause several biological effects in bacteria (*vide* Siqueira Jr., J.P. & Azevedo, J.L., Rev. Brasil. Genet., 5:619, 1982). Furocoumarins-NUV, like intercalative compounds, may cause relaxation of supercoiled DNA (Yoakum, G.H. & Cole, R.S., Biochim. Biophys. Acta 521:529, 1978), and may also act at the biological membrane level (Frederiksen, S. & Hearst, J.E., Biochim. Biophys. Acta 563:343, 1979).

The purpose of this work was to evaluate the effect of a psoralen, 8-methoxysoralen, plus near UV light (8MOP-NUV) on the loss of extrachromosomal drug resistance in a strain of *Staphylococcus aureus*. The strain used was 609tet-r, carrying a plasmid for tetracycline resistance (Lacey, R.W., J. Gen. Microbiol.,

\* This paper is dedicated to the memory of Prof. Cyro Grossi

69:229, 1971). The treatment was as described elsewhere (Siqueira Jr., J.P. & Azevedo, J.L., *op.cit.*); the concentration of 8MOP was 0.115 mM and the dose rate of NUV was ~ 20 W/cm<sup>2</sup>, estimated by biological methods. A suspension of bacteria containing no 8MOP was also irradiated. Isolated colonies from treated bacteria were plated onto nutrient agar containing tetracycline (10 µg/ml), in order to detect tetracycline-sensitive variants. Stability of drug resistance was determined in the presence of ethidium bromide (Bouanchaud, D.H.; Scavizzi, M.R. & Chabbert, Y.A., *J. Bacteriol.*, 54:417, 1969), and after growth at elevated temperature (Asheshov, E.H., *J. Gen. Microbiol.*, 42:403, 1966). Lysates were obtained with lysostaphin from strain 609tet-r and from sensitive variants and submitted to agarose gel electrophoresis as described elsewhere (Bastos, M.C.F. & Penido, E.G.C., *Rev. Brasil. Genet.*, 4:41, 1981); strain 13136, carrying a plasmid for tetracycline resistance, MW 2.9 x 10<sup>6</sup> daltons (Lacey, R.W. & Grinsted, J., *J. Med. Microbiol.*, 6:511, 1973), was used as reference.

After 8MOP-NUV treatment sensitive variants were obtained at a frequency as high as 1.70%, but at a dose that cause a high level of killing (~99.99%). The results obtained with doses of NUV that causes slight killing (Siqueira Jr., J.P. & Azevedo, J.L., *op.cit.*) gave better evidence of the effect of 8MOP-NUV on the loss of resistance to tetracycline, and are showed in Table 1.

No sensitive variants were obtained after treatment with ethidium bromide in 4 experiments. After growth at elevated temperature, also carried out in 4 experiments, in only one, sensitive variants were obtained at a frequency of 0.12%. The frequency of sensitive variants for all controls was 0.00%. Lacey, R.W. (*op.cit.*), studying the same strain, obtained 0.04% loss of tetracycline resistance after growth at elevated temperature.

The results obtained with agarose gel electrophoresis was quite clear: simultaneously with the disappearance of the phenotypic trait after 8MOP-NUV treatment, a band that might be identified as that related to the plasmid carrying the gene for tetracycline resistance also disappeared. Thus, a new biological effect of 8MOP-NUV on bacteria- cure of plasmid- has been showed in the present work.

**Table 1** - Loss of resistance to tetracycline in the strain 609tet-r of *Staphylococcus aureus* after NUV irradiation, in presence and absence of 8MOP

**Symbols:** \* in parentheses: number of colonies tested; \*\* survival: ~70% (with 8MOP), ~82% (without 8MOP)

| Irradiation time (sec.) | Percentage of sensitive variants |              |
|-------------------------|----------------------------------|--------------|
|                         | with 8MOP                        | without 8MOP |
| 0                       | 0.21 (484)*                      | 0.18 (556)   |
|                         | 0.00 (340)                       | 0.00 (390)   |
|                         | 0.00 (480)                       | -            |
|                         | 0.15 (648)                       | -            |
| 20**                    | 1.17 (515)                       | 0.13 (784)   |
|                         | 1.10 (180)                       | 0.00 (330)   |
|                         | 1.25 (240)                       | -            |
|                         | 0.30 (329)                       | -            |

#### Acknowledgements

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil (CNPq/PIG).

## GO-SLIDER COMO MEIO DE TRANSPORTE. AVALIAÇÃO TÉCNICA

Daniel Lang

Luiz Fernando de Góes Siqueira

Walter Belda

Manuel Fernando Queiroz dos Santos Jr

Mauricio Correa Silveira

Faculdade de Saúde Pública USP

Dermatologia Sanitária

Av. Dr. Arnaldo 715

01255 São Paulo SP, Brasil

& Waldemar Francisco

Instituto de Ciências Biomédicas USP

Dept. de Microbiologia

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cidade Universitária USP

05508 São Paulo SP, Brasil

### **Resumo**

Testa-se o GO-SLIDE, para cultura e transporte de *Neisseria gonorrhoeae*, como sistema de transporte. São estudadas as variáveis temperatura e tempo de transporte, sendo mantidos constante teor de umidade e de CO<sub>2</sub>. O sistema apresentou seu melhor rendimento entre 20,0°C e 35,0°C de temperatura de transporte.

### **Summary**

#### *GO-SLIDE as a transport medium. Technical evaluation*

The GO-SLIDE medium is evaluated as a *Neisseria gonorrhoeae* transport system. Time and temperature of transport are the studied variables. The humidity and the CO<sub>2</sub> concentration were maintained constant throughout the experiment. This system proved to be more useful between 20,0°C and 35,0°C as transport temperature.

### **Introdução**

A gonorréia é especialmente difícil de ser detectada em mulheres. Muitas são portadoras assintomáticas. A coloração de Gram, frequentemente utilizada como critério suficiente no diagnóstico desta doença em pacientes masculinos, é considerada inconclusiva em pacientes do sexo feminino. Estudos recentes têm evidenciado portadores assintomáticos masculinos. Em tais casos a presença da *Neisseria gonorrhoeae* pode não ser detectada no diagnóstico baseado na bacterioscopia (9).

O marcante aumento da incidência de gonorréia evidenciou a necessidade de novos procedimentos laboratoriais para o isolamento do agente etiológico. O desenvolvimento do meio de Thayer - Martin, em 1964, representou o primeiro maior avanço na cultura da *Neisseria gonorrhoeae* (14). A partir de então, o meio original de Thayer-Martin vem sofrendo modificações (2, 8, 10, 11, 12, 13, 15). O Thayer-Martin modificado (4) (TM), atualmente, é o mais utilizado em todo o

mercado. Esta técnica de cultivo é considerada o método mais sensível na detecção da *Neisseria gonorrhoeae*, com particular valor no diagnóstico de casos precoces, crônicos ou tratados e, no isolamento do germe de pacientes assintomáticos de ambos os sexos.

Apesar do diagnóstico laboratorial da gonorréia ter sido facilitado pelo uso da cultura em meio seletivo, os estudos continuaram objetivando encontrar um meio apropriado para o transporte do material contendo *Neisseria gonorrhoeae*. Por ser o gonococo uma bactéria exigente e altamente suscetível às variações de condições ambientais, o espécime deve ser transportado ao laboratório em condições especiais, de modo que sua viabilidade seja preservada durante o período em trânsito.

Os meios de Stuart e Amies foram inicialmente utilizados, porém a sobrevivência nestes meios não ultrapassa quatro horas, desde que não sejam submetidos a temperaturas extremas. Estudos a partir do TM culminaram em um sistema denominado "Transgrow", constituído de recipiente em forma de garrafa contendo o meio seletivo combinado às condições atmosféricas apropriadas (6).

Entretanto o "Transgrow" apresenta algumas dificuldades que devem ser analisadas quanto à utilização a nível de um programa em Saúde Pública. O sistema em garrafa tem sua operacionalidade prejudicada pela técnica rigorosa de semeadura, implicando na perda da atmosfera de CO<sub>2</sub>, se inclinado o frasco. A água de condensação, que frequentemente se acumula na superfície do meio, proporciona crescimento de microrganismos contaminantes e interfere na formação de colônias isoladas. Em adição, subcultivos são dificultados pelo acesso estreito que apresenta o recipiente e pela superfície plana inclinada (7).

Com o objetivo de neutralizar as dificuldades inerentes ao sistema de garrafa, foi criado um outro sistema de transporte conhecido como "placa JEMBEC" (5). Este sistema, composto de uma placa contendo meio de TM, uma pastilha geradora de CO<sub>2</sub> e um envólucro plástico, apresenta vantagens como o fácil manuseio (por ser constituído de uma superfície plana e inteiramente acessível, simplificando a semeadura, a leitura e a obtenção de colônias isoladas), além de gerar o CO<sub>2</sub> após a semeadura, o que preserva o teor necessário deste gás. Entretanto, sua durabilidade é reduzida, podendo ser estocado apenas por quatro a seis semanas, enquanto o "Transgrow" apresenta um tempo hábil de estocagem de três meses.

Um novo sistema foi recentemente lançado, mantendo os mesmos princípios, porém tendo como metas, superar os problemas apresentados nos precursores. Denominado GO-SLIDE (F. Hoffmann - La Roche Go, Basel - Switzerland) este sistema de transporte é ainda indicado para o primo-isolamento, dispensando isolamentos secundários na rotina de identificação da *Neisseria gonorrhoeae*.

O objetivo deste estudo é testar o GO-SLIDE como sistema de transporte, controlando as possíveis variáveis intervenientes por ocasião do transporte. Trata-se de um dado de importância não só para o Brasil, que apresenta em sua grande extensão territorial uma variação climática acentuada, como para países que apresentem variações climáticas ou percursos longos até o laboratório.

## **Material e Métodos**

O GO-SLIDE é constituído de um recipiente de plástico transparente que guarda uma lâmina presa à tampa de forma centralizada. Uma das faces da lâmina é coberta com meio TM (face 1); a face oposta, por Ágar chocolate enriquecido, objetivando o isolamento de espécimes sensíveis aos antibióticos utilizados como impedientes no meio TM (1,3). Acompanha o sistema uma pastilha geradora de CO<sub>2</sub>, que após semeadura, é depositada no recipiente de plástico, utilizando apenas a água de condensação do meio.

Este estudo controlou particularmente a temperatura e o tempo do transporte, considerando o teor de umidade e de CO<sub>2</sub> constantes, por tratar-se de um sistema fechado. Definimos por transporte, o tempo existente entre a colheita e a incubação do sistema em estufa à temperatura ideal de crescimento da *Neisseria gonorrhoeae* (35,5°C - 36,5°C). Foram controladas as temperaturas de 15,0°C, 20,0°C, 25,0°C, 30,0°C, 35,0°C e 40,0°C, bem como os tempos de transporte de dois, quatro, oito, dezesseis e vinte horas. Coletou-se os materiais de pacientes portadores de

uretrite gonocócica aguda atendidos no serviço de Doenças Sexualmente Transmissíveis da Dermatologia Sanitária da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, após comprovação pelo exame bacterioscópico. As amostras foram coletadas com o auxílio de alça de platina calibrada (0,001 ml), padronizando-se o inóculo e proporcionando uma análise quantitativa do crescimento bacteriano.

De um mesmo paciente foram coletados materiais e semeados simultaneamente em seis sistemas GO-SLIDE, para estudo de uma única temperatura de cada vez, controlando-se apenas, a variável tempo de transporte. Esta, representada, respectivamente, por zero hora (como controle qualitativo e quantitativo de crescimento, 2, 4, 8, 16 e 20 horas de transporte. Uma placa de TM foi também utilizada, com o objetivo de controlar o sistema GO-SLIDE. Para cada temperatura foram utilizados materiais de pacientes diferentes. A avaliação quantitativa foi efetuada por meio da contagem do número de colônias crescidas no sistema controle (zero hora) e nos demais sistemas, a cada tempo de transporte, segundo a fórmula para obtenção do crescimento percentual bacteriano:

$$\% \text{ crescimento em } t'x = \frac{\text{nº de colônias } t'x}{t'o} \cdot 100$$

$t'$  = tempo de transporte

Procedemos ao arredondamento lógico dos percentuais de crescimento.

## Resultados

Os resultados são apresentados nas Figuras 1 e 2.

## Discussão

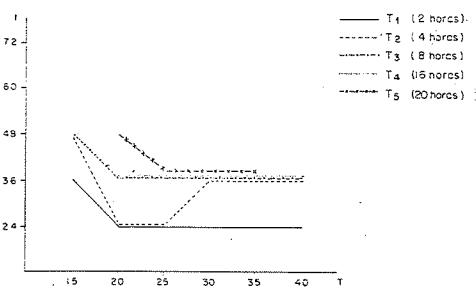
Os resultados apresentados na Figura 1, referentes ao tempo de crescimento da *Neisseria gonorrhoeae*, segundo tempo e temperatura de transporte, mostram-nos que em qualquer tempo de transporte, na temperatura mais baixa, ou seja 15,0°C, o sistema de transporte parece passar por um processo de conservação semelhante ao fornecido pelas temperaturas em portas de geladeira, retardando contudo um pouco o tempo de crescimento. Entretanto analisando a Figura 2, referente ao percentual de crescimento, observamos que esta temperatura (15,0°C) não traz prejuízos para o crescimento bacteriano nos tempos de dois, quatro e oito horas de transporte, nos quais é representado por 100%. Nos tempos subsequentes, a baixa temperatura, à medida que aumenta o tempo de transporte, parece exercer um efeito deletério, interferindo no crescimento a um nível de perda de 50% em 16 horas e uma perda total em 20 horas de transporte.

Nas demais temperaturas compreendidas entre 20,0°C e 35,0°C não existe retardamento no tempo do crescimento bacteriano para qualquer tempo de transporte (Figura 1), tendo seu rendimento oscilado entre 100% e 50% e sendo inversamente proporcional ao tempo de transporte. Como exceção, os tempos de 2 e 4 horas, que além de melhor rendimento (Figura 2) as culturas apresentaram crescimento iniciado em 24 horas (Figura 1).

Observamos ainda que acima de 35,0°C o percentual do crescimento bacteriano diminui acentuadamente, de forma que nos tempos de transporte de 16 horas e 20 horas as perdas atingem de 90% a 100%.

**Figura 1 - Distribuição do tempo de crescimento da *N.gonorrhoeae*, segundo tempo e temperatura do período de transporte.**

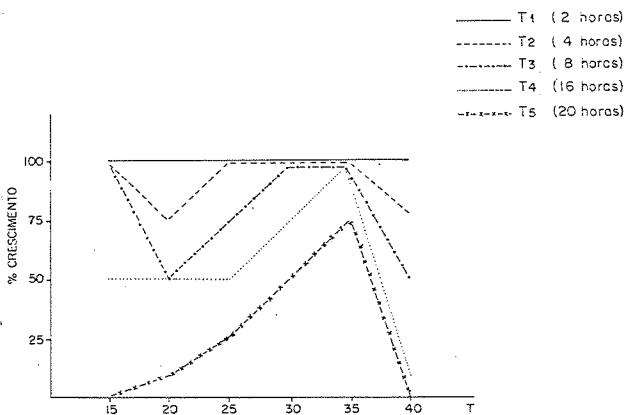
Símbolos: T - temperatura no período de transporte; t - tempo decorrido até o crescimento colonial.



O estudo realizado com o sistema CO-SLIDE para cultura e transporte, nos levou a concluir que seu maior rendimento e suas condições de maior segurança estão situadas entre 20,0°C e 35,0°C e até 16 horas de transporte. Aconselhamos ainda, para manutenção de seu melhor rendimento, que em localidades de baixas ou altas temperaturas o sistema de transporte seja acondicionado em caixas, refrigerando-as ou aquecendo-as de modo a manter a temperatura de transporte na faixa de segurança acima citada. Entretanto nos tempos de transporte acima de 16 horas esta temperatura de transporte deve ser mantida entre 30 e 35°C para minimizar as perdas.

**Figura 2 - Distribuição do percentual de crescimento da *N.gonorrhoeae*, segundo tempo e temperatura do período de transporte.**

Símbolo: T - temperatura no período de transporte.



#### Referências Bibliográficas

1. Brorson, J.E.; Holmberg, J.; Nygren, B. & Seberg, S. - Vancomycin-sensitive strains of *Neisseria gonorrhoeae*. A problem for the diagnostic laboratory. Br. J. Vener. Dis., 49:452-453, 1973.
2. Center for Disease Control - Gonorrhea United States. Morbid. Mortal. Weekly Rep., 28:533-534, 1979.
3. Cross, R.C.; Hager, M.B.; Neibaur, R.; Pasternak, B. & Brady, F.J. - VCN-Inhibited strains of *Neisseria gonorrhoeae*. HSMHA Health Rep., 86:990-992, 1971.
4. Martin Jr., J.E.; Armstrong, J.H. & Smith, P.B. - New system for cultivation of *Neisseria gonorrhoeae*. Appl. Microbiol., 27:802-805, 1974.
5. Martin Jr., J.E. & Jackson, R.L. - A biological environment chamber for the culture of *Neisseria gonorrhoeae*. J. Am. vener. Dis. Assoc., 2:28-30, 1975.
6. Martin Jr., J.E. & Lester, A. - Transgrow, a medium for transport and growth of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis*. HSMHA Health Rep., 86:30-33, 1971.
7. Morello, J.A. & Bohnhof, M. - *Neisseria* and *Branhamella*, p. 114-130. In: Lennette, E.H. - Manual of clinical microbiology. 3 ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1980.
8. Odegaard, K. - Trimethoprim for the prevention of overgrowth by swarming protens in the cultivation of gonococci. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B., 79:545-548, 1971.
9. Pariser, H. - Asymptomatic gonorrhea. Med. clin. North Am., 56:1127-1132, 1972.
10. Reyn, A. - Recent developments in the laboratory diagnosis of gonococcal infections. Bull. WHO, 40:245-253, 1969.
11. Rey, A. & Bentyn, M.W. - Comparison of a selective and nonselective medium in the diagnosis of gonorrhoeae to ascertain the sensitivity of *Neisseria gonorrhoeae* to vancomycin. Br. J. vener. Dis., 48:363-368, 1972.
12. Ridell, R.H. & Bucks, A.C. - Trimethoprim as an additional selective agent in media for the isolation of *N. gonorrhoeae*. J. clin. Pathol., 23:481-483, 1970.
13. Seth, A. - Use of trimethoprim to prevent overgrowth by proteus in the cultivation of *N. gonorrhoeae*. Br. J. vener. Dis., 46:201-202, 1970.
14. Tayer, J.T.D. & Martin Jr., J.E. - A selective medium for a cultivation of *N. gonorrhoeae* and *N. meningitidis*. Public Health Resp., 79:49-57, 1964.
15. Whitbeck, E.; Shemansky, N. & Levison, M.E. - Superiority of amphotericin over nistatin in Thayer Martin medium. Agents chemother., 7:658-660, 1975.

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE DESINFETANTES DOMÉSTICOS

Jorge Timenetsky  
& Flávio Alterthum

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

### **Summary**

#### *Determination of antibacterial activity of domestic disinfectants*

After the introduction of use-dilution method as official assay to evaluate disinfectants in Brazil, official entities have published the first results upon evaluation of hospital disinfectants. In the first step, the results showed that only a few disinfectants were qualified. The disinfectants for domestic use were not evaluated yet. In this work, some disinfectants for domestic use were tested by use-dilution method (10 carriers) and by a quantitative adapted method. The use-dilution method indicated that four of the products overcome the microbiological necessities established for domestic disinfectants eight reached the desired microbiological levels but nine did not reach these minimal microbiological levels. The quantitative method showed that seven products presented germicidal effect 5,0 in 15 seconds. Some products in their recommended dilutions showed poor antibacterial activity, while others showed no activity at all.

### **Resumo**

As entidades oficiais estão emitindo os primeiros resultados da avaliação microbiológica de desinfetantes hospitalares após a adoção, no Brasil, da metodologia da diluição-uso. Verificou-se, numa primeira etapa, que poucos produtos foram qualificados. Para os desinfetantes domésticos esta oportunidade ainda não ocorreu. Neste trabalho, alguns produtos desinfetantes de uso doméstico foram avaliados pela metodologia qualitativa da diluição-uso (10 carreadores) e uma metodologia quantitativa adaptada. Os resultados da metodologia da diluição-uso revelaram que quatro produtos atingiram padrões microbiológicos superiores aos necessários para desinfetantes domésticos, oito estariam dentro dos padrões e nove estariam desqualificados. A metodologia quantitativa revelou que sete produtos provocaram efeito germicida 5,0 com 15 segundos de contato com as bactérias. Cinco produtos provocaram o mesmo efeito germicida mas ao longo de cinco minutos. Alguns produtos, nas diluições recomendadas, para uso revelaram possuir atividade antibacteriana mais reduzida ou inexistente.

### **Introdução**

Até 1983 não existiam orientações, por parte das entidades oficiais, para o uso e a escolha de desinfetantes (4).

Rev. Microbiol., São Paulo, 19(1):46-51, Jan./Mar. 1988.

Em 1985, através do Ministério da Saúde estabeleceram-se oficialmente os padrões microbiológicos (5) e posteriormente a metodologia (11) para avaliação dos desinfetantes domésticos, institucionais e hospitalares, para efeito de registro. Numa etapa primeira da avaliação de desinfetantes hospitalares verificou-se que apenas três produtos, dos 44, existentes poderiam ser registrados (6). Atualmente existem cerca de 13 produtos qualificados, mas alguns tornaram-se relativamente tóxicos (7), pois as concentrações dos compostos ativos foram aumentados pelos fabricantes.

Os desinfetantes hospitalares para área não críticas (áreas administrativas) e institucionais (ambientes públicos) são avaliados frente cepas padronizadas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis*. Em se tratando de desinfetantes hospitalares para áreas semicríticas (enfermarias) e críticas (salas cirúrgicas), bem como para os equipamentos hospitalares, além das três cepas anteriores, incluem-se cepas padronizadas de *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium smegmatis* e *Trichophyton mentagrophytes*.

Não há ainda nenhum comunicado oficial com relação aos produtos domésticos, como ocorreu para os hospitalares. Os padrões microbiológicos são mais flexíveis e devem ser testados pela metodologia da diluição-uso frente *S.aureus* e *S.choleraesuis*.

Para um desinfetante ser qualificado, deve na diluição recomendada para uso, inativar em 10 minutos as bactérias contidas em 59 cilindros carreadores contaminados num total de 60 (11). Cada cilindro possui aproximadamente  $10^6$  bactérias da cepa padronizada (16). Quanto menor o número de espécies envolvidas na avaliação, maior a chance do produto ser qualificado e consequentemente registrado. Assim, quando um produto é qualificado através desta metodologia qualitativa revela-se na realidade aproximadamente um efeito gemicida 8,0 em relação ao inóculo contido nos 60 cilindros (16). Entretanto, uma ou mais bactérias sobreviventes num carreador podem turvar um meio de subcultivo, ocultando uma atividade antibacteriana que pode ser interessante e que não pode ser revelada num método qualitativo como a diluição-uso.

Os métodos de avaliação microbiológica dos desinfetantes que mais se aproximam das condições e necessidades reais, são os mais desejáveis (1, 15). Esta situação tem sido muito discutida diante de outros métodos. Os métodos quantitativos tem sido considerados importantes pois a atividade antibacteriana fica melhor caracterizada (8, 10, 12, 16, 17).

A atividade antibacteriana de alguns produtos de uso doméstico foi pesquisada através da metodologia de diluição-uso (10 carreadores) e de uma metodologia quantitativa adaptada.

## **Material e Métodos**

**Microrganismos:** *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) e *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708) (11).

**Meios de Cultura:** Caldo e Ágar Nutriente (Difco) duplamente concentrado adicionado de NaCl (5,0 g/l); Ágar Cistina Trypticase (BBL) (11).

Tubos 25 x 150 mm (subcultivo, diluições e teste dos desinfetantes) (11).

Alça bacteriológica padronizada (com 4,0 mm de diâmetro) (11).

Agulha de transferência dos cilindros (ponta formando ângulo reto) (11).

Agitador de tubos tipo "Vortex", Baflo maria a 20°C, cilindros carreadores, papel filtro, solução de asparagina a 1,0% (11).

**Desinfetantes - Composição - Diluições recomendadas para uso (Tabela 1).**

Os desinfetantes foram avaliados frente às bactérias, na temperatura a 20°C, nas diluições recomendadas no rótulo. A metodologia da diluição-uso baseou-se na

proposta pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) com 10 cilindros carreadores (quantidade para triagem) (11) e sem a utilização de neutralizantes de compostos ativos.

Nas metodologias quantitativa e qualitativa, as bactérias foram mantidas para as condições experimentais do modo descrito no Manual do INCQS.

Na metodologia quantitativa, 0,5 ml da cultura bacteriana, após incubação a 37°C durante 24h, foi adicionado a 5ml do desinfetante. Estas proporções foram escolhidas porque já estão padronizadas para a determinação da resistência das bactérias ao fenol segundo a metodologia do Coeficiente Fenólico (11). Após 15 segundos, 1, 2 e 5 minutos da elaboração desta suspensão (bactérias + desinfetantes), retirou-se uma amostra com alça padronizada, para subcultivo em 15 ml de Ágar Nutriente fundido e resfriado a 40°C. Em seguida, verteu-se o meio fundido em placa de Petri, incubando o sistema por 48 horas a 37°C, para posterior contagem de colônias (u.f.c.). Cada experimento foi novamente repetido, mas desta vez as amostras foram transportadas para 10ml de solução fisiológica estéril, para posterior diluição e plaqueamento. Desta maneira, os produtos que apresentassem atividade antibacteriana mais reduzida poderiam evidenciar mais claramente o número de bactérias sobreviventes, permitindo as contagens de colônias em cada avaliação.

A diferença do logaritmo do número de colônias de cada amostragem em relação ao controle (número de bactérias em cada alçada) permitiu estabelecer o efeito germicida (17).

A alça padronizada transporta um volume aproximado de 0,01ml e, numa etapa controle, verificou-se que possuía em média  $2,5 \times 10^5$  células viáveis de *S. aureus*,  $4,9 \times 10^5$  de *P. aeruginosa* e  $2,7 \times 10^5$  de *S. choleraesuis*.

Considerou-se que os resíduos de desinfetantes transportados para os subcultivos, tanto na metodologia qualitativa como na quantitativa, foram inativados pela diluição. O controle desta etapa revelou que os possíveis resíduos não interferiram nos resultados, pois houve desenvolvimento bacteriano na metodologia quantitativa e não se alterou o número de u.f.c. na metodologia quantitativa. Os resíduos foram adicionados diretamente nos meios de subcultivo, que por sua vez possuíam bactérias viáveis nas condições de cada metodologia. Adicionou-se uma alçada do desinfetante, na metodologia quantitativa, e um cilindro carreador estéril, previamente imerso no

Tabela 1 - Avaliação da atividade antibacteriana dos desinfetantes de uso doméstico, através da metodologia da diluição-uso com 10 carreadores.

Símbolo: O numerador representa subculturas com desenvolvimento num total de 10.

|     | Desinfetante  | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>S. choleraesuis</i> |
|-----|---|------------------|----------------------|------------------------|
| 1.  | HARPIC-WC (puro)<br>amônio quaternário                      | 0/10             | 1/10                 | 0/10                   |
| 2.  | SAN-PIC PINHO (puro)<br>amônio quaternário                  | 0/10             | 4/10                 | 0/10                   |
| 3.  | KALIPIO (puro)<br>fenol+amônio quaternário                  | 0/10             | 1/10                 | 0/10                   |
| 4.  | PINHO BRIL (puro)<br>fenol sintético                        | 0/10             | 1/10                 | 0/10                   |
| 5.  | PINHO WHITE (puro)<br>fenol sintético                       | 0/10             | 1/10                 | 0/10                   |
| 6.  | PINHO SOL (puro)<br>fenol sintético                         | 2/10             | 1/10                 | 0/10                   |
| 7.  | TOK PINHO (puro)<br>fenol sintético                         | 0/10             | 1/10                 | 0/10                   |
| 7A  | TOK PINHO (1/30)  | 2/10             | 10/10                | 2/10                   |
| 8.  | WHITAK (puro)<br>fenol sintético+formol                     | 0/10             | 2/10                 | 0/10                   |
| 9.  | WHITE (puro)<br>fenol sintético+formol                      | 1/10             | 2/10                 | 0/10                   |
| 10. | LYSOFORM BRUTO (puro)<br>formol                             | 0/10             | 0/10                 | 0/10                   |
| 10A | LYSOFORM BRUTO (1/80)                                       | 9/10             | 10/10                | 9/10                   |
| 11. | FANNY EUCALIPTO (puro)<br>formol                            | 10/10            | 10/10                | 10/10                  |
| 12. | FAN LAVANDA (puro)<br>formol                                | 10/10            | 10/10                | 10/10                  |
| 13. | FAN JASMIN (puro)<br>formol                                 | 10/10            | 10/10                | 10/10                  |
| 14. | PINHO LIDER (puro)<br>formol                                | 0/10             | 0/10                 | 0/10                   |
| 15. | DESINFETANTE (puro)<br>(Formulação e uso não especificados) | 10/10            | 10/10                | 10/10                  |
| 16. | ÁLCOOL ZULU (puro)<br>Álcool etílico uso não especificado   | 0/10             | 0/10                 | 0/10                   |
| 16A | ÁLCOOL ZULU (70%)   | 0/10             | 0/10                 | 0/10                   |
| 17. | SUPER CANDIDA (puro)<br>cloro ativo                         | 0/10             | 0/10                 | 0/10                   |
| 17A | SUPER CANDIDA (1/10)  | 0/10             | 5/10                 | 10/10                  |
| 17B | SUPER CANDIDA (1/40)  | 10/10            | 10/10                | 10/10                  |

mais claramente o número de bactérias sobreviventes, permitindo as contagens de colônias em cada avaliação.

A diferença do logaritmo do número de colônias de cada amostragem em relação ao controle (número de bactérias em cada alçada) permitiu estabelecer o efeito germicida (17).

A alça padronizada transporta um volume aproximado de 0,01ml e, numa etapa controle, verificou-se que possuía em média  $2,5 \times 10^5$  células viáveis de *S. aureus*,  $4,9 \times 10^5$  de *P. aeruginosa* e  $2,7 \times 10^5$  de *S. choleraesuis*.

Considerou-se que os resíduos de desinfetantes transportados para os subcultivos, tanto na metodologia qualitativa como na quantitativa, foram inativados pela diluição. O controle desta etapa revelou que os possíveis resíduos não interferiram nos resultados, pois houve desenvolvimento bacteriano na metodologia quantitativa e não se alterou o número de u.f.c. na metodologia quantitativa. Os resíduos foram adicionados diretamente nos meios de subcultivo, que por sua vez possuíam bactérias viáveis nas condições de cada metodologia. Adicionou-se uma alçada do desinfetante, na metodologia quantitativa, e um cilindro carreador estéril, previamente imerso no

desinfetante, na metodologia qualitativa.

As bactérias padrões utilizadas neste trabalho foram recuperadas em todos os experimentos controles e nas avaliações dos desinfetantes. Os experimentos das metodologias qualitativas e quantitativas foram realizados em triplicata.

## Resultados e Discussão

Pode-se verificar, na Tabela 1, que os produtos números 10, 14, 16, 16A e 17 atingiram os padrões microbiológicos para desinfetantes institucionais e hospitalares para áreas não críticas, pois permitiram a recuperação das três espécies na metodologia da diluição-uso com 10 carreadores (11). Os produtos números 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8 e 17A atingiram os padrões para desinfetantes domésticos, pois permitiram a recuperação de *P. aeruginosa* (11). Ainda, na Tabela 1, verifica-se que existem produtos cujas diluições recomendadas para uso permitiram a recuperação das três espécies bacterianas e os produtos números 11, 12, 13, 15 e 17B não revelaram atividade antibacteriana nas condições experimentais. Os produtos que atingiram os padrões microbiológicos poderiam ser ainda desqualificados se fossem testados frente a 60 carreadores (11).

A metodologia quantitativa permitiu classificar os resultados em três grupos. Os desinfetantes números 1, 2, 4, 7, 8, 16, 16A e 17 não permitiram caracterizar a recuperação de bactérias sobreviventes observada através da contagem de colônias com apenas 15 segundos de contato, evidenciando portanto um efeito germicida 5,0. No segundo grupo os desinfetantes números 3, 5, 6, 7A, 8, 9, 14 e 17 (Tabela 2) provocaram o mesmo efeito germicida frente às três espécies, mas ao longo de 5 minutos. No terceiro grupo, os desinfetantes números 10A, 11, 12, 13, 15 e 17B não provocaram efeito germicida 5,0 ao longo dos 5 minutos. A atividade máxima para estes foi verificada na quarta amostragem apenas frente à *S. choleraesuis*.

**Tabela 2** - Avaliação da atividade antibacteriana dos desinfetantes de uso doméstico através da metodologia quantitativa de verificação do efeito germicida. Avaliações efetuadas após 15 segundos, 1, 2 e 5 minutos.

| Desinfe-<br>tante | <i>S. aureus</i> |        |        | <i>P. aeruginosa</i> |        |        | <i>S. choleraesuis</i> |        |        |
|-------------------|------------------|--------|--------|----------------------|--------|--------|------------------------|--------|--------|
|                   | tempo<br>15 seg. | 1 min. | 2 min. | tempo<br>15 seg.     | 1 min. | 2 min. | tempo<br>15 seg.       | 1 min. | 2 min. |
| 3                 | 2,7              | 2,7    | 2,8    | 2,7                  | 5,0    | 5,0    | 5,0                    | 5,0    | 5,0    |
| 5                 | 3,1              | 3,2    | 5,0    | 5,0                  | 5,0    | 5,0    | 5,0                    | 5,0    | 5,0    |
| 6                 | 2,6              | 2,6    | 5,0    | 5,0                  | 5,0    | 5,0    | 5,0                    | 5,0    | 5,0    |
| 7A                | 1,8              | 5,0    | 5,0    | 0,9                  | 1,2    | 1,8    | 1,9                    | 5,0    | 5,0    |
| 8                 | 5,0              | 5,0    | 5,0    | 2,5                  | 5,0    | 5,0    | 5,0                    | 5,0    | 5,0    |
| 9                 | 0,1              | 0,1    | 0,1    | 0,5                  | 1,4    | 5,0    | 5,0                    | 2,1    | 5,0    |
| 14                | 1,9              | 2,6    | 5,0    | 5,0                  | 5,0    | 5,0    | 5,0                    | 5,0    | 5,0    |
| 17A               | 0,1              | 5,0    | 5,0    | 5,0                  | 5,0    | 5,0    | 0,7                    | 5,0    | 5,0    |
| 10A               | 0,0              | 0,0    | 0,0    | 0,0                  | 0,1    | 0,2    | 0,0                    | 0,0    | 1,1    |
| 11                | 0,1              | 0,3    | 0,3    | 0,9                  | 0,0    | 0,5    | 0,8                    | 0,0    | 1,2    |
| 12                | 0,0              | 0,2    | 0,2    | 0,8                  | 0,0    | 0,5    | 0,9                    | 0,0    | 2,1    |
| 13                | 0,0              | 0,2    | 0,2    | 0,6                  | 0,0    | 0,6    | 0,6                    | 0,0    | 2,2    |
| 15                | 0,1              | 0,5    | 0,8    | 1,3                  | 0,0    | 0,0    | 0,0                    | 0,8    | 1,5    |
| 17B               | 0,0              | 0,3    | 0,3    | 0,8                  | 0,0    | 0,0    | 0,1                    | 0,0    | 0,8    |

Os valores de até 0,3 na metodologia quantitativa devem ser desconsiderados como atividade antibacteriana, pois são decorrentes das variações inerentes ao ensaio adaptado, constatadas numa etapa controle.

Os produtos números 10, 16, 16A e 17 revelaram atividade antibacteriana máxima tanto na metodologia qualitativa como na quantitativa. A maioria dos desinfetantes avaliados neste trabalho, devem ser utilizados sem diluição segundo as instruções dos respectivos rótulos, mas mesmo assim alguns não revelaram atividade antibacteriana.

Os produtos números 15 (DESINFETANTE) e 16 (ÁLCOOL ZULU) não possuem instruções para o uso correto na desinfecção. Desta maneira, foram avaliados sem prévia diluição. Entretanto o ÁLCOOL ZULU (96% GL) (16A) foi também avaliado a 70% (14) e a SUPER CANDIDA a 1/10 (17A), diluições não constantes dos respectivos rótulos.

As metodologias envolvem situações diferentes durante a ação dos desinfetantes sobre as bactérias e os resultados podem oferecer interpretações práticas. Na diluição-uso, as bactérias estão aderidas a 10 carreadores, na metodologia quantitativa as bactérias estão em suspensões e existe uma alteração adicional de 10% na solução do desinfetante quando o inóculo é adicionado. O tempo de contato e o inóculo da metodologia quantitativa é menor do que na qualitativa, mas nesta o volume da solução do desinfetante é o dobro do utilizado na metodologia quantitativa.

A atividade antibacteriana com efeito germicida 5,0 (99,99% de redução) constatado aos 15 segundos, praticamente imediata, pode ser mais interessante do que uma atividade antibacteriana constatada aos 5, 10, 30 minutos ou mais através de outros métodos de avaliação microbiológico de desinfetante.

Fatores interferentes como tipo de piso (liso, áspero, poroso, etc), ventilação, evaporação e temperatura, teriam menos chance de prejudicar a ação antibacteriana de um agente desinfetante químico durante um processo de desinfecção. Esta situação não pode ser ignorada pois representa condições reais de uso.

Em ambiente domiciliares, existem contaminações por microrganismos indesejáveis (3, 9, 18, 19). Pessoas sadias são menos suscetíveis a infecções do que pacientes hospitalizados (2, 4, 7, 13, 21), também é necessário que os microrganismos estejam em dose e em sítio suscetível (20). Desta maneira, recém-nascidos e idosos, costumam ser mais suscetíveis a infecções.

Os desinfetantes domésticos devem possuir atividade antimicrobiana no sentido de atender às necessidades de cada ambiente; também não devem ser entendidos como "líquidos miraculosos" solucionadores de problemas de contaminação, mas agentes complementares no contexto geral da desinfecção.

A desinfecção não deve ser confundida com a desodorização provocada por agentes aromatizantes, o que torna geralmente ilusória a utilização de desinfetantes em ambientes domésticos. Esta ilusão induz ao uso incorreto, como por exemplo a elaboração de diluições arbitrárias e que consequentemente tornam-se ineficazes.

## Conclusões

Alguns desinfetantes domésticos possuem a capacidade de reduzir em 99,999% populações bacterianas em 15 segundos, possuindo portanto uma ação praticamente imediata e interessante para as condições práticas de uso.

Alguns produtos avaliados pela metodologia da diluição-uso poderiam ser qualificados como desinfetantes institucionais e outros como desinfetantes domésticos.

Entretanto um grupo de produtos desinfetantes, nas diluições recomendadas, possuem atividade antibacteriana mais reduzida ou inexistente observada respectivamente na metodologia quantitativa e qualitativa.

## Referências Bibliográficas

1. Alterthum, F. Antissépticos e desinfetantes. In: Zanini, A.C. & Oga, S. Farmacologia Aplicada, São Paulo, Atheneu São Paulo, 1985, p.575-82.
2. Ayliffe, G.A.J. & Collins, B.J. Problems of disinfection in hospitals. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Eds. Russell, A.D.; Huggo, W.B.; Ayliffe, G.A.J. London, Blackwell, 1982. p. 244-59.
3. Bloomfield, S.F. The use of disinfectants in home: a review. J. Appl. Bacteriol., 45:1-38, 1978.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 196 de 24 de junho de 1983. Diário Oficial da União, Brasília, 28 de junho de 1983, sec. 1/1319.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 67 de 21 de fevereiro de 1985. Diário Oficial da União, Brasília, 27 de fevereiro de 1985, sec. 1/3181.
6. Brasil. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Desinfetantes Domissanitários: comunicação sobre interdição cautelar de desinfetantes hospitalares, Brasília, 16 de junho de 1986.

7. Brasil. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Atualização sobre desinfetantes hospitalares. Comunicado nº 4, DISAO, 21 de maio de 1987.
8. Cremieux, A. & Fleurette, J. Methods of testing disinfectants. In: Disinfection, sterilization and preservation. Ed. S.S. Block. Philadelphia, Lea & Febiger, 1983: cap. 46, p. 918-44.
9. Gerba, C.P.; Wallis, C.; Melnik, J.L. Microbiological hazards of household toilets: droplet production and the fate of residual organisms. *Appl. Microbiol.*, 30:229-37, 1975.
10. Groschel, D.H.M. Sterilization, disinfection and antisepsis. In: Sonnenwirth, A.C. & Jaret, L. eds- Gradwhol's clinical laboratory methods and diagnosis. 8 ed. Saint Louis, CV Mosby, p. 978, 1980.
11. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Técnicas para controle de qualidade: avaliação da atividade antibacteriana de saneantes domissanitários. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1985. (Manual Técnico nº 04/85).
12. Klinger, B. van Experience with a quantitative carrier test for the evaluation of disinfectants. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. B.*, 167:514-27, 1978.
13. Moraes, M.; Baptista, A.S.F.; Aguiar, N. Infecção hospitalar. Comissão de controle de infecção hospitalar: constituição e objetivos. In: Ferraz, E.M. Manual de controle de infecção em cirurgia. São Paulo. Colégio Brasileiro de Cirurgiões, E.P.U., 1983, cap. 7, p. 65-72.
14. Morton, H.E. Alcohols. In: Disinfection, sterilization and preservation. Ed. S.S. Block. Philadelphia. Lea & Febiger, 1983. cap. 10. p. 225-37.
15. Oliveira, M.S.; Timenetsky, J.; Silva, L.F.; Alterthum, F. Reflexões sobre a desinfecção hospitalar. *Laes & Haes* 4(4):66-68, 1985.
16. Reybrouck, G. A theoretical approach of disinfectant testing. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. B.*, 160:342-67, 1975.
17. Reybrouck, G. The evaluation of the antimicrobial activity of disinfectants. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Eds. Russell, A.D.; Hugo, W.B.; Ayliffe, G.A.J. London, Blackwell, 1982. cap. 4, p.134-55.
18. Scott, E. & Bloomfield, S.F. A bacteriological investigation of the effectiveness of cleaning and disinfection procedures for toilet hygiene. *J. Appl. Bacteriol.*, 59:291-7, 1985.
19. Scott, E.; Bloomfield, S.F.; Barlon, C.G. An investigation of microbial contamination in the home. *J. Hyg.*, 89:279-93, 1972.
20. Wedum, A.G.; Barkley, W.F.; Hellman, A. Handling of infectious agents. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 161:1557-67, 1972.
21. World Health Organization. Laboratory methods. In: Hospital acquired infections: Guidelines to laboratory methods. Ed. M.T. Parker. Geneve, 1978 (W.H.O. Regional Publications European Series, nº 14).

## INFLUENCE OF CALCIUM ON THE THERMAL STABILITY OF BACTERIAL $\alpha$ -AMYLASE

Beatriz Vahan Kilikian  
 Marina Kahvedjian  
 & Willibaldo Schmidell Netto

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

### Summary

It is quite frequent the employment of  $\alpha$ -amylase during the dextrinization of starch materials, in order to reduce the medium viscosity. Calcium cations are very often used to ensure the preservation of the enzyme thermostability. In the present work we determined, through viscosity measurements, that the presence of 0.3 g Ca/l of a 15% starch solution, added as chloride or sulfate, is sufficient for the effective action of  $\alpha$ -amylase produced by *Bacillus subtilis*, acting in a temperature range of 70 to 80°C. As raw material we used sorghum grains-flours.

### Resumo

#### *Influência do cálcio na estabilidade térmica de $\alpha$ -amilase bacteriana*

Na dextrinização de materiais amiláceos, é muito frequente o uso de  $\alpha$ -amilase, com a finalidade de reduzir a viscosidade do meio. A termoestabilidade da enzima, é garantida pela presença de cátions cálcio. No presente trabalho, determinou-se através de medidas de viscosidade, que a presença de 0.3 gCa/l em meio contendo 15% de amido, adicionado como cloreto ou sulfato, é suficiente para a ação efetiva de  $\alpha$ -amilase produzida por *Bacillus subtilis*, atuando entre 70 a 80°C. Como fonte de amido utilizou-se farinha de grãos de sorgo.

### Introduction

The gelatinization of a starch material, defined as the swelling of the starch granules suspended in the mash by the action of temperature, is a necessary step that precedes the starch hydrolysis.

The gelatinization is accomplished by a rapid rise in the medium viscosity; the temperature at which this phenomenon occurs is almost fixed and depends on the starchy material (5). In order to guarantee the medium homogeneity  $\alpha$ -amylase is usually added which, by a random hydrolysis of the  $\alpha$ -1, 4 linkages in the polysaccharide molecules, causes a drastic reduction in the viscosity. At the end of this process we have the production of dextrans presenting lower molecular weights.

Several factors can interfere in the viscosity during gelatinization: the rate of temperature rising, the starch concentration and source, the quantity of  $\alpha$ -amylase

added and its source (4), and the presence of calcium cations in solution.

It is well known that calcium is a thermal stabilizer for a large number of enzymes (3, 9), and in particular for the  $\alpha$ -amylase (2, 7, 8).

In the present work, using sorghum grains-flours, as the starchy material, we determined the calcium concentration needed to stabilize the  $\alpha$ -amylase, together with the enzyme concentration, through viscosities determinations during the gelatinization.

## Material and Methods

**Enzyme.**  $\alpha$ -amylase from *Bacillus subtilis*, furnished by Pfizer S.A., was used in the experimental runs. The optimal conditions for the action of this enzyme are: pH between 6.8 and 7.0, and temperature 85°C. In all cases we will express the enzyme activity in BAU (Bacterial  $\alpha$ -amylase units) (6).

**Source of calcium.** Anhydrous calcium chloride, anhydrous calcium carbonate, and  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  were used as calcium ion source.

**Experimental procedure.** We employed a Biolafitte fermentor, containing 7l of the sorghum (variety BR-501) flour suspension. This suspension was prepared with 150 g starch/l, suspended with a 0.01N NaOH solution, containing the calcium salt in the proper concentration.

During the heating operation the agitation speed was maintained at 700 rpm, and the enzyme was added when the temperature reaches above 55°C. The samples were collected periodically starting 65°C for measurement of viscosity. When the medium temperature reached 85°C, this condition was maintained during 1 hour, and three samples were collected at 0,30 and 60 minutes. The rate of the temperature rise was the same in all runs: 1.59°C/min until 73°C, and 0.239°C/min from 73°C until 85°C.

**Viscosity determination.** The samples collected at certain temperature were immediately maintained at the same reactor temperature in a thermostat. The measurement of the viscosity was made by a Brookfield Synchro Lectric model RV, using the spindle RV 3 and 100rpm as agitation frequency. The time required for this measurement was only 1.5 to 2 min.

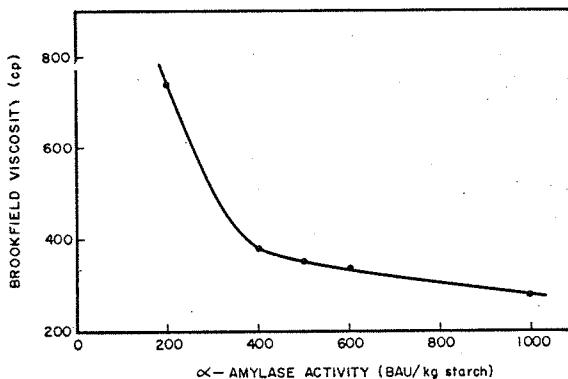
## Results and Discussion

In preliminary runs we observed that the gelatinization temperature, at which a rapid rise in viscosity values occurs, was around 73°C. By this reason we made several runs in which we measured the viscosity only in the gelatinization point, using different values of the  $\alpha$ -amylase activity and a fixed concentration of 1.82 g Ca/l added as chloride.

The results obtained, showed in Figure 1, indicate a drastic reduction in the viscosity when we rise the enzyme activity from 200 to 500 BAU/kg starch. Above this value relatively little progress occurs.

Another interesting observation is that hydrolysis

Figure 1 - Brookfield viscosity as function of the  $\alpha$ -amylase activity used, in the gelatinization point.



curves (not showed here) with the material gelatinized, using amyloglucosidase, are coincidents despite the different ratios of  $\alpha$ -amylase and starch used during the gelatinization, confirming the observations of Carr & col. (1).

Figure 2 shows the results of the assays where we fixed the content of  $\alpha$ -amylase in 500 BAU/kg starch, and varied the concentration of calcium from 0.11 to 1.82 g Ca/l (also added as chloride). It was impossible to perform the gelatinization in the absence of calcium, because the viscosity rose above 10,000 cp.

This finding is like an absence of the enzyme activity, indicating clearly that the calcium cations have an essencial function on the enzyme viability in this conditions.

The viscosity values measured in the gelatinization point (73°C) and also the end of the cooling period (50°C), as a function of calcium concentration, are showed in Figure 3.

From the results of Figures 2 and 3, we can point out that the improvement of the process is quite evident when we rise the calcium concentration from 0.11g Ca/l until 0.22g Ca/l or 0.29g Ca/l. Above these calcium concentrations, in terms of viscosity reduction, the progress is less noticeable, which allow us to recommend the use of a value around 0.3g Ca/l in order to obtain an adequate operation.

The use of  $\text{CaSO}_4$ ,  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{CaCl}_2$ , corresponding to a calcium concentration of 0.36g Ca/l together with an  $\alpha$ -amylase activity of 500 BAU/kg starch, are compared in Figure 4. As it can be observed  $\text{CaSO}_4$ , is as efficient as  $\text{CaCl}_2$ , as a source of calcium, but the run with  $\text{CaCO}_3$  (due to the low solubility of this salt) had to be interrupted because of the extremely high viscosity values attained, similarly to the run without any calcium.

Figure 2 - Brookfield viscosity as a function of temperature and calcium concentration: 0.11g Ca/l (●), 0.15g Ca/l (○), 0.18g Ca/l (▲), 0.22g Ca/l (△), 0.29g Ca/l (■), 0.36g Ca/l (□), 1.82g Ca/l (+)

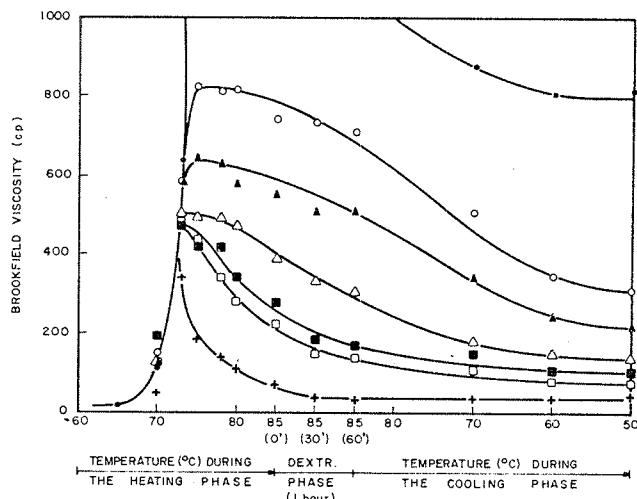
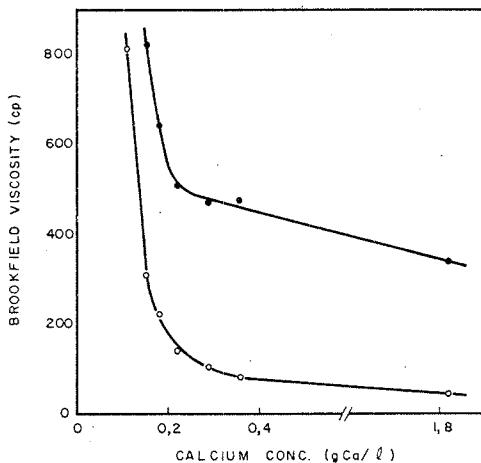
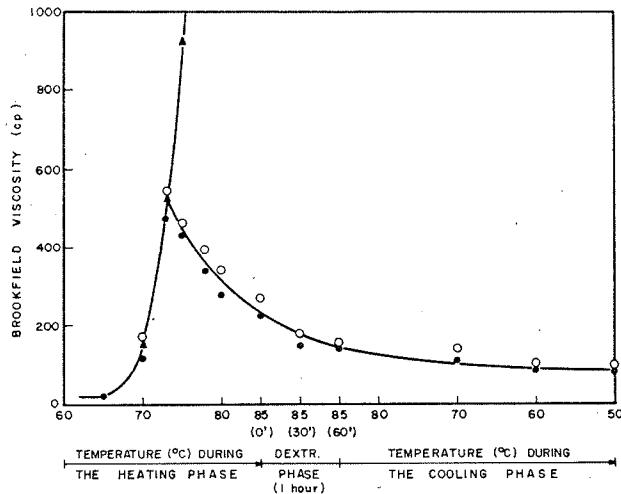


Figure 3 - Maximum (●) and final (○) values of the Brookfield viscosity obtained during the dextrinization as a function of the calcium concentration added as chloride.



**Figure 4 - Effect of the calcium salt used on the Brookfield viscosity. Calcium concentration fixed in 0.36g Ca/l added as  $\text{CaCl}_2$  (●),  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (○) and  $\text{CaCO}_3$  (▲).**



## Conclusions

The gelatinization and dextrinization of the sorghum grain starch, can be performed with an  $\alpha$ -amylase activity of 500 BAU/kg starch, being obligatory the use of calcium as an enzyme stabilizer. A concentration around 0.3g Ca/l of a 15% starch suspension, in the form of chloride or sulfate, is recommended.

## Acknowledgment

Partial support of this work by Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) is gratefully acknowledged.

## References

- Carr, M.E.; Black, L.T. & Bagby, M.O. - Continous enzymatic liquefaction of starch for saccharification. Biotechnol. and Bioeng., 24:2441-2449, 1982.
- Hoogerheide, J.C. - Microbial enzymes other than fungal amylase. In: Underkofler, L.A. & Hickey, R.J., eds. - New York, Industrial fermentations. Eds. Chemical Publishing, vol. 2, 1954.
- Johnson, E.A.; Sakajoh, M.; Halliwell, G.; Madia, A. & Demain, A.L. - Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulose system from *Clostridium thermocellum*. App. and Environ. Microb., 43:1125-1132, 1982.
- Menezes, T.J.B.; Lamo, P.R.; Sales, A.M. & Arakari, T. - Sistemas de hidrólise na produção do álcool etílico da mandioca. Colet. Inst. Tec. Alim., 7:209-215, 1976.
- Park, Y.K.; Werner, H.B. & Papini, R.S. - Relação entre intumescimento, gelatinização e suscetibilidade dos amidos de mandioca e de milho à alfa-amilase bacteriana. Rev. Bras. Tecnol., 2:95-99, 1971.
- Pfizer - Technical Bulletin nº BT-001/78, 1978.
- Reed, G. - Food Science and Technology. New York, Academic Press, Series of Monographs: 483, 1966.
- Schmid, R.D. - Stabilized soluble enzymes. In: Ghose, T.K.; Fiechter, A. & Blakebrough, N. eds. - Advances in biochem. eng., Berlin, Springer Verlag, vol. 12, 1979.
- Veissseyre, R. - Lactologia técnica. 2.ed., Zaragoza, Anibia, 1972.

## METHODOLOGICAL ADEQUACY FOR SUSCEPTIBILITY TEST OF *ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS* TO ANTIMICROBIAL DRUGS\*

Mario Julio Avila-Campos

Depto de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas UFMG  
Av. Antonio Carlos, 6627  
30161 Belo Horizonte MG, Brasil

Edmar Chartone de Souza

Depto de Biologia Geral  
Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Luiz de Macêdo Farias  
Maria Auxiliadora Roque de Carvalho  
Carlos Américo Veiga Damasceno  
& Eduardo Osório Cisalpino

Depto de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas UFMG  
Av. Antonio Carlos, 6627  
30161 Belo Horizonte MG, Brasil

### **Summary**

An optimization of the methodology to test the susceptibility of microorganisms to drugs, through the utilization of low cost, fast, reliable and reproducible processes was reported, using *A. actinomycetemcomitans* as a model, taking into consideration its peculiarities.

### **Resumo**

### ***Adequação metodológica para testes de susceptibilidade de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* a drogas antimicrobianas***

Procurou-se aprimorar a metodologia para testes de susceptibilidade de microrganismos a drogas, utilizando-se recursos simples, de baixo custo, de processamento rápido, confiáveis, tomando o *A. actinomycetemcomitans* como modelo, dadas as suas peculiaridades.

### **Introduction**

The development of reliable test for antimicrobial drugs susceptibility must take several parameters into consideration, whose quality control is dubious. Needless to mention, one of the critical points still is the proper inoculum standardization. This is made difficult due to the various physiological variations of the microorganisms.

It is well known that most of the bacteria have a very diffuse growth in liquid media. This had led to the utilization of the medium turbidity degree as a means to obtain the proper number of cells for inoculation purposes. McFarland scale has

\* Auxílio parcial CNPq, Processo nº 406.022/85.

been used as reference where the turbidity of the culture medium is compared with that obtained by the addition of 0.5ml of a 1.17% solution of  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  to 99.5ml of 0.36N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

However, in several circumstances such as a first isolation or in recent cultures, some microorganisms may have a characteristic growth with no turbidity of the medium. This makes impossible or difficult the use of this method. Sometimes, the successive transfers result in lack of growth. Consequently, the drug susceptibility tests should be carried out as soon as a pure culture has been obtained. Discrepancies between results are thus avoided.

Obviously, it is of fundamental importance the search for new methods that would result in simple and fast ways to use a reliable inoculum and to determine the cell number by other but the turbidity method. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a microaerophile, capnophytic or anaerobic Gram-negative bacteria (2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12) of great medical and odontological importance. It has a characteristic growth, forming clots that adhere to the walls or deposit at the bottom of the tubes with no turbidity.

This microorganism was used as a model to test the antimicrobial drug susceptibility, a very controversial subject (1, 3, 9). A low cost, simple, reliable and reproducible method was devised.

The procedure proposed here deals, particularly, with some aspects related to liquid medium, to the problems related with dilutions and standardization of the growth conditions and to the reliability of the inoculum size aiming the determination of the cell population used in the antimicrobial susceptibility tests.

### **Material and Methods**

The following strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* were used: ATCC 29524 and NCIC 9710; isolated from the environment (2 strains) and from human oral cavity (4 strains). They were utilized for inoculum standardization for antimicrobial drug susceptibility.

They were grown in brain heart infusion-agar-blood (BHI-B-agar) in conditions of microaerophily (candle method) at 37°C for 48 hours. One colony of each strain was then transferred to a test tube containing 5ml of BHI-S-broth (supplemented with yeast extract and L-cysteine) and five glass beads with a diameter of approximately 0.5mm. Incubation was carried out as described above, after which the purity of the culture was tested by Gram staining. The culture was then dispersed by Vortex for 30 seconds. The same procedure was followed for dilutions up to  $10^{-10}$  in test tubes containing 9.0ml of BHI-S broth with five beads per tube.

Once the proper dilutions were obtained, aliquots of 0.1ml of each tube were transferred to three Petri dishes of 100x20mm, containing the medium of Wilkins & Chalgren (10) for anaerobes. A sterile glass rod was used for spreading the sample. The plates were incubated as described above for 72 hours.

Finally, the colonies were counted in all plates for every dilution. The average was as the number of cells/ml for each dilution.

### **Results and Discussion**

The average colony count of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* from human and environmental strains as well as from reference strains was between  $10^4$  to  $10^5$  cell/ml at 1:100 dilution (table 1). The table shows the regularity of the number of cells/ml at different dilutions, regardless of the source of the strains, indicating the reproducibility of the procedure. The standardization of the shaking time of tubes in Vortex and the addition of glass beads led to a homogeneous dispersion of the clots. There was a good inverse correlation between the number of microorganisms and the degree of dilution. It must also be emphasized that, on microscopic examination, there was a complete dispersion of the clots. Based on the growth aspect on the corresponding cell number at several dilution levels, an ideal

inoculum of  $10^4$  to  $10^5$  cells/ml was determined. With this standardization, one may safely perform the antimicrobial susceptibility tests. The chances of finding mutant cells which are resistant to the antibiotics to be assayed are minimal.

The standardization of the inoculum is one of the critical points in the reliability of the results on antimicrobial drug susceptibility tests (1, 9). The methodology that has been used up to the present time has not taken into consideration the peculiarities of several microbial species. Obviously, this leads to false results and may affect the indication of the proper therapy.

**Table 1** - Number of cells/ml of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* incubated for 48 hours, at 37°C under microaerophilyia in BHI-S broth obtained from inocula derived from different sources (reading was done in Wilkins & Chalgren agar, after incubation for 48-72 hours at 37°C under microaerophilyia)

Symbols: \*ATCC 29524 and NCTC 9710.

| Origin and number of tested strains | Average number of cells/ml in the indicated dilutions |                 |                 |                 |               |           |           |           |           |            |
|-------------------------------------|---|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
|                                     | $10^{-1}$   | $10^{-2}$       | $10^{-3}$       | $10^{-4}$       | $10^{-5}$     | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | $10^{-9}$ | $10^{-10}$ |
| Environment (2)                     | $10^5$ - $10^6$                                       | $10^4$ - $10^5$ | $10^3$ - $10^4$ | $10^2$ - $10^3$ | $10$ - $10^2$ | 1- $10$   | 0-1       | 0         | 0         | 0          |
| Human oral Cavity (4)               | $10^5$ - $10^6$                                       | $10^4$ - $10^5$ | $10^3$ - $10^4$ | $10^2$ - $10^3$ | $10$ - $10^2$ | 1- $10$   | 0-1       | 0         | 0         | 0          |
| Reference (2)*                      | $10^5$ - $10^6$                                       | $10^4$ - $10^5$ | $10^3$ - $10^4$ | $10^2$ - $10^3$ | $10$ - $10^2$ | 1- $10$   | 0-1       | 0         | 0         | 0          |

The method described was used with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with success. An adequate and reliable number of cells was used as inoculum. This permitted an equally reliable interpretation of results obtained with antimicrobial drugs. A great care must be taken, particularly in the standardization of the strain when one deals with anaerobes, since this group is physiologically quite heterogeneous.

The proposed method is not certainly the final solution to the problem. It offers a guarantee of reproducibility and quality control.

### Acknowledgments

The authors are indebted to Dr Enio Cardillo Vieira for his cooperation, helpful suggestions and critical reading to the manuscript and Luzia Rosa Resende for the technical help.

### References

1. Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Damasceno, C.A.V.; Cisalpino, E.O.; Campos, M.J.A. & Costa, J.E. - Susceptibilidade de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolados de lesões periodontais humanas a drogas antimicrobianas. Arq. Cent. Est. Cur. Odont., 22:25-38, 1985.
2. Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Damasceno, C.A.V.; Cisalpino, E.O. & Costa, J.E. - Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolados de lesões periodontais humanas. Rev. Microbiol., 17:296-306, 1986.
3. Hoffler, U.; Niederau, W. & Pulverer, G. - Susceptibility of *Bacterium actinomycetem-comitans* to 45 antibiotics. Antimicrob. Agents Chemother., 17:943-946, 1980.
4. Kiley, P. & Holt, S.C. - Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y<sub>4</sub> and N<sub>27</sub>. Infection and Immunity, 30:862-873, 1980.
5. Listgarten, M.A.; Lai, C.H. & Evian, E.I. - Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally healthy subjects. J. Clin. Periodont., 8:115-164, 1981.

6. Mandell, R.L. & Socransky, S.S. - A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J. Periodont.*, 52:593-598, 1981.
7. Pulverer, G. & Ko, H.L. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: fermentative capabilities of 140 strains. *Appl. Microbiol.*, 20:693-695, 1970.
8. Thjotta, T.H. & Sydnes, S. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* as the sole infecting agent in a human being. *Acta Pathol. Scand.*, 28:27-35, 1951.
9. Wilkins, T.D. & Thiel, T. - Modified broth-disk method for testing the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 3:350-356, 1973.
10. Wilkins, T.D. & Chalgren, S. - Medium for use in antibiotics susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10:926-928, 1976.
11. Zambon, J.J.; Slots, J. & Genco, R.J. - Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infect. Immun.*, 41:19-27, 1983.
12. Zambon, J.J.; Slots, J.; Miyasaki, K.; Linzer, R.; Cohen, R.; Levine, M. & Genco, R.J. - Purification and characterization of the serotype c antigen from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.*, 44:22-27, 1984.

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA À TETRACICLINA, KANAMICINA, CLORANFENICOL DE ESTIRPES DE BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM E BRADYRHIZOBIUM DE STYLOSANTHES ISOLADAS DE SOLO DE CERRADOS**

Maria Rita Scotti

Deptº de Botânica

Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Caixa Postal 2486

31270 Belo Horizonte MG, Brasil

Nadja Maria Horta de Sá

Deptº de Botânica

Instituto de Ciências Biológicas UFMG

Caixa Postal 2486

31270 Belo Horizonte MG, Brasil

Milton Alexandre T. Vargas

Centro de Pesquisa Agropecuária CPAC dos Cerrados

EMBRAPA

Caixa Postal 700023

73300 Planaltina DF, Brasil

& Johanna Döbereiner

EMBRAPA/PNPBS

Km 47 da antiga Rio-São Paulo

23460 Seropédica RJ, Brasil

**Resumo**

Visando estabelecer os fatores bióticos que poderiam estar interferindo na nodulação de soja (*Glycine max (L) merrill*) e *Stylosanthes* em solos de cerrado, avaliou-se a tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e *Bradyrhizobium* de *Stylosanthes* à tetraciclina, kanamicina e cloranfenicol. Observou-se que a maioria das estirpes de *B. japonicum* isoladas dos cerrados, toleraram níveis de 40,0 $\mu$ g/ml, 20,0 $\mu$ g/ml e 300,0 $\mu$ g/ml de tetraciclina, kanamicina e cloranfenicol respectivamente. As estirpes de *Bradyrhizobium* indicadas como inoculantes comerciais para a soja, apresentaram níveis similares exceto para a kanamicina, cuja resistência situou-se na faixa de 10,0 $\mu$ g/ml. Os diferentes sorogrupos das estirpes de soja praticamente não alteraram seus níveis de tolerância a estes antibióticos após cinco anos de persistência no solo. As estirpes nativas de *Bradyrhizobium* de *Stylosanthes* não apresentaram diferenças significativas nos níveis de tolerância aos antibióticos testados tanto em cerrado virgem como cultivado. A tolerância média entre essas estirpes e as comerciais indicadas para o gênero *Stylosanthes* atingiram faixas de 2,5 a 20,0 $\mu$ g/ml para a kanamicina, 1,0 a 40,0 $\mu$ g/ml para a tetraciclina e 2,0 a 300,0 $\mu$ g/ml para o cloranfenicol.

**Summary**

*Evaluation for tetracycline, kanamycin and chloranphenicol resistance of Bradyrhizobium japonicum and Bradyrhizobium of Stylosanthes isolated from cerrado soils*

Rev. Microbiol., São Paulo, 19(1):60-66, Jan./Mar. 1988.

In order to establish the biotic factors that might be interfering in soybean nodulation (*Glycine max (L) merrill*) and *Stylosanthes* in savanna soils (cerrado), an evaluation was carried out regarding the tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium (Stylosanthes)* strains to tetracycline, kanamycin and chloranfenicol.

The study showed that most strains of *B. japonicum* isolates obtained in savannas had tolerance levels of 40.0 $\mu$ g/ml, 20.0mg/ml and 300.0 $\mu$ g/ml to tetracycline, kanamycin and chloranfenicol, respectively. *Bradyrhizobium* strains indicated as commercial inoculants for soybean showed similar levels of tolerance except to kanamycin, whose resistance ranged at 10.0 $\mu$ g/ml. The different soybean strains serogroups practically showed no alteration in their levels of tolerance to these antibiotics after five years of persistence in soil. Native strains of *Bradyrhizobium* from *Stylosanthes* have shown no significant differences in tolerance levels to antibiotics tested both in uncultivated and cultivated "cerrado".

Average tolerance between these strains and commercial ones indicated for *Stylosanthes* have reached ranges of 2.5 to 20.0 $\mu$ g/ml for kanamycin, 1.0 to 40.0 $\mu$ g/ml for tetracycline and 2.0 to 300.0 $\mu$ g/ml for chloranphenicol.

## Introdução

Problemas de nodulação da soja nos primeiros anos de cultivo de cerrado e estabelecimento de *Stylosanthes*, nestes solos, foram atribuídos à ação antagonista de actinomicetos, produtores naturais de antibióticos, sobre a população de *Rhizobium*. Os actinomicetos, especialmente do gênero *Streptomyces*, constituem uma elevada porcentagem (75-94%) da microflora dos solos de cerrados (3), podendo portanto, desempenhar um importante papel no equilíbrio microbiano e comprometer o estabelecimento e a nodulação de leguminosas nesses solos, similamente ao observado em outras regiões (9).

A predominância de bactérias tolerantes à estreptomicina na rizosfera de leguminosas (2) e cereais (1) poderia ser resultante da presença destas substâncias produzidas continuamente por microrganismos antagonistas, o que poderia favorecer estirpes de *Rhizobium* resistentes na colonização, infecção e nodulação de leguminosas. Em solos de cerrados, foram observados índices elevados de resistência à estreptomicina em estirpes de *Rhizobium japonicum* (18) e estirpes de *Rhizobium* sp. associadas a *Stylosanthes* (17). Estirpes de *R. japonicum* comerciais, introduzidas nos cerrados, apresentaram-se sensíveis a níveis de 10,0 a 20,0 $\mu$ g/ml de estreptomicina e nodularam deficienteamente a soja, porém as estirpes 29W e 587, tolerantes a respectivamente 80,0 e 160 $\mu$ g/ml do antibiótico estabeleceram-se e predominaram nestes solos. Aquelas estirpes comerciais de outros sorogrupos originalmente sensíveis, quando estabelecidas nos cerrados, aumentaram seus níveis de resistência para 40,0 a 80,0 $\mu$ g/ml do antibiótico. Estirpes de *Rhizobium* sp de *Stylosanthes* isoladas de solos de cerrados cultivados, tratados com calagem, foram resistentes a níveis iguais ou superiores a 40,0 $\mu$ g/ml de estreptomicina, enquanto estirpes isoladas de solos virgens e estirpes comerciais indicadas para o gênero foram sensíveis predominantemente nas faixas de 2,5 a 10,0 $\mu$ g/ml.

Esses resultados sugeriram que em solos de cerrados cultivados ocorre uma seleção natural de estirpes tolerantes à estreptomicina, as quais possuem maior vantagem competitiva para nodulação nestes solos.

Similarmente, estirpes de *Rhizobium* do grupo cowpea isoladas de solos amazonenses, alteraram sua tolerância à estreptomicina de 20,0 $\mu$ g/ml para 150,0 $\mu$ g/ml após 5 anos de cultivo, como também apresentaram-se resistentes à tetraciclina, cloranfenicol, penicilina e gentamicina. Essa tolerância aos antibióticos citados parece ser uma característica adquirida naturalmente nos solos cultivados intensivamente, já que em laboratório estirpes de *Rhizobium* mutantes induzidos,

tolerantes à estreptomicina, mostraram-se sensíveis aos demais antibióticos citados (5).

Sendo a população de *Streptomyces* muito elevada nos cerrados, outros antibióticos, além da estreptomicina poderiam estar sendo produzidos e afetar as estirpes de *Rhizobium* presentes. Visando avaliar esta influência foi proposto o presente trabalho.

#### Material e Métodos

Selecionou-se cinco regiões sob cerrado (Brasília, Uberlândia, Araxá, Uberaba e Ituiutaba) onde a soja (*Glycine Max (L) merrill*) vinha sendo cultivada há cerca de 3 a 5 anos. Nessas regiões a inoculação da soja foi feita com estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* comerciais (29W, 587, R54a, 566, CB1809, 965, 532C) somente nos primeiros anos de cultivo, portanto, no ano da amostragem não houve inoculação.

Para essa amostragem foram coletados, a partir das cultivares de soja (Santa Rosa, UFV<sub>1</sub>, Paraná, IAC-2, IAC-5 e Bossier), nódulos formados pelas estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* já adaptadas ao solo de cerrado.

Os nódulos de *Stylosanthes guianensis* e *S. grandifolia* foram coletados em áreas de cerrado virgem (Brasília e Uberaba) e em áreas de cerrado cultivado (Sete Lagoas). A partir dos nódulos de soja e *Stylosanthes* coletados procedeu-se o isolamento dos mesmos segundo técnica descrita por Vincent (21). Esses isolamentos foram submetidos a testes de infectividade em tubos contendo plântulas de *Macropygium atropurpureum* c.v. siratro visando caracterização das estirpes como do gênero *Bradyrhizobium* segundo Vincent (21). Obteve-se cerca de 280 estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* e cerca de 230 estirpes de *Bradyrhizobium* de *Stylosanthes*. As estirpes de *B. japonicum* e *Bradyrhizobium* sp isoladas do cerrado e as estirpes comerciais indicadas para soja e *Stylosanthes* foram testadas quanto à susceptibilidade relativa a antibióticos pelo método de diluição em ágar (4, 6), utilizando-se meio de cultura contendo manitol e extrato de levedura agarizado (YMA) segundo Vincent (21). Após esterilização por filtração (Millipore GSW-P 025) os antibióticos fosfato de tetraciclina (Bristol S.A.), sulfato de kanamicina (Bristol S.A.) e Hemissuccinato de Cloranfenicol (Parke-Davis), foram incorporados ao meio YMA em concentrações crescentes - diluições duas vezes (8). A kanamicina foi dissolvida em água (10) e a tetraciclina e o cloranfenicol dissolvidos em etanol 95% (4).

Inóculos padronizados em meio líquido de extrato de levedura e manitol (Y;A) contendo 107 unidades formadoras de colônias (UFC/ml) (4,8) foram inoculados nas placas, utilizando-se quatro repetições para cada concentração do antibiótico. Após 3 dias de incubação a 29°C, efetuava-se a leitura, comparando-se com o crescimento das placas-controle sem antibiótico. O nível de resistência foi definido como a maior concentração do antibiótico em que se observava crescimento confluinte em pelo menos 3 das 4 repetições utilizadas.

As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas dos cerrados foram identificadas pelo método de aglutinação (21) com antisoros específicos das estirpes comerciais de *B. japonicum*.

#### Resultados e Discussão

As estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas dos cerrados foram tipificadas com antisoros específicos das estirpes comerciais de *B. japonicum* (29W, 587, R54a, 566, 527, 532c e CB1809) presentes nesses solos. Dentre 195 estirpes de *B. japonicum* isoladas dos cerrados, identificadas sorológicoicamente, (Tabela 3) a maioria pertenceu aos sorogrupo 29W (40%) e 587 (35%), poucas estirpes (16%) se distribuíram entre os sorogrupo 965, 566, CB1809 e 532c e apenas 8% das estirpes dos cerrados apresentaram reações inespecíficas. Estirpes do sorogrupo R54a não foram encontradas nos nódulos de soja isolados das 5 diferentes regiões dos cerrados. A predominância das estirpes 29W e 587 indica maior vantagem competitiva

dessas estirpes, seja para sobrevivência nos solos de cerrados, seja para a infecção e nodulação da soja.

A resistência intrínseca ou natural das bactérias do gênero *Rhizobium*, de maneira geral, tem se apresentado relativamente baixa aos antibióticos kanamicina (4,0 a 10,0 $\mu$ g/ml), tetraciclina (1,0 a 25,0 $\mu$ g/ml) e relativamente alta para o cloranfenicol (2,0 a 300,0 $\mu$ g/ml) (4, 8, 10, 11).

Dentre as estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas dos cerrados, cerca de 257 estirpes foram testadas quanto à susceptibilidade à tetraciclina e os resultados (Tabela 2) indicaram que a maioria das estirpes (70%) foram tolerantes a 40,0 $\mu$ g/ml do antibiótico. Esse comportamento foi similar ao das estirpes comerciais de *B. japonicum* usadas rotineiramente no Brasil (Tabela 1) mas representam índices

**Tabela 1 - Resistências a tetraciclina, kanamicina e cloranfenicol de estirpes comerciais de *Bradyrhizobium japonicum*<sup>1</sup> e *Bradyrhizobium de Stylosanthes*<sup>2</sup>.**

| Estirpes             | Origem                    | Nível de resistência ( $\mu$ g/ml) <sup>a</sup> |            |               |
|----------------------|---------------------------|---|------------|---------------|
|                      |                           | Tetraciclina                                    | Kanamicina | Cloranfenicol |
| 29W <sup>1</sup>     | Rio de Janeiro            | 40,0  | 10,0       | 320,0         |
| R54a <sup>1</sup>    | Rio de Janeiro            | 20,0  | 20,0       | 100,0         |
| 532c <sup>1</sup>    | Rio Grande do Sul         | 20,0  | 10,0       | 160,0         |
| 587 <sup>1</sup>     | Rio Grande do Sul         | 40,0  | 10,0       | 320,0         |
| 566 <sup>1</sup>     | Estados Unidos da América | 40,0  | 10,0       | 160,0         |
| CB1809 <sup>1</sup>  | Austrália                 | 40,0  | 20,0       | 160,0         |
| 965 <sup>1</sup>     | Japão                     | 20,0  | 20,0       | 160,0         |
| SB3 <sup>2</sup>     | Rodésia                   | 5,0   | 2,5        | 5,0           |
| CIAT308 <sup>2</sup> | Colômbia                  | 5,0   | 20,0       | 5,0           |
| CIAT316 <sup>2</sup> | Colômbia                  | 40,0  | 160,0      | 600,0         |
| CIAT350 <sup>2</sup> | Colômbia                  | 1,0   | -          | 40,0          |
| CIAT365 <sup>2</sup> | Colômbia                  | 2,5   | 10,0       | 20,0          |
| Be23a <sup>2</sup>   | Rio de Janeiro            | 1,0   | 2,5        | 5,0           |
| Br 1a <sup>2</sup>   | Rio de Janeiro            | 5,0   | 5,0        | 40,0          |

de resistência superiores aqueles descritos na literatura (4, 8). As tipificações sorológicas dos nódulos de soja (Tabela 3) indicaram que estirpes dos sorogrupos 566, CB1809, 532c, 29W e 587 e mesmo aquelas de reação inespecífica não alteraram seus níveis de resistência à droga. As estirpes comerciais indicadas para *Stylosanthes*, apresentaram faixas de tolerância mais baixas ao antibiótico que as de *B. japonicum*, com apenas duas exceções CB756 e CIAT316 (Tabela 1). Os resultados obtidos com as estirpes nativas de *Bradyrhizobium de Stylosanthes*, isoladas dos cerrados nos testes com tetraciclina foram semelhantes aos das estirpes comerciais, apresentando maior incidência de resistência de 5,9 a 10,0 $\mu$ g/ml (Figura 1). Em solos cultivados e virgens 17% e 22% respectivamente das bactérias foram resistentes a níveis iguais ou superiores a 40,0 $\mu$ g/ml do antibiótico.

**Tabela 2 - Resistência à tetraciclina, kanamicina e cloranfenicol de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas de nódulos de soja em solos de cerrado.**

Símbolos: (a) Concentração máxima de antibiótico onde ainda houve crescimento de *Bradyrhizobium* em placas contendo meio de extrato de levedura-manitol (YMA).

| $\mu$ g/ml (a) de antibiótico | Tetraciclina<br>Nº de estirpes testadas | % total | Kanamicina<br>Nº de estirpes testadas | % total | Cloranfenicol<br>Nº de estirpes testadas | % total |
|-------------------------------|---|---------|---------------------------------------|---------|--|---------|
| 1                             | 0                                       | 0       | 1                                     | 0,5     | 0  | 0       |
| 2                             | 0                                       | 0       | 4                                     | 2       | 0  | 0       |
| 5                             | 2                                       | 1       | 6                                     | 3       | 0  | 0       |
| 10                            | 7                                       | 3       | 36                                    | 16      | 0  | 0       |
| 20                            | 29                                      | 11      | 150                                   | 68      | 0  | 0       |
| 40                            | 180                                     | 70      | 20                                    | 9       | 0  | 0       |
| 80                            | 35                                      | 14      | 0                                     | 0       | 9  | 6       |
| 160                           | 1                                       | 1       | 3                                     | 1       | 34                                       | 23      |
| 320                           | 2                                       | 1       | 1                                     | 0,5     | 79                                       | 53      |
| 640                           | 1                                       | 1       | -                                     | -       | 27                                       | 18      |

Os testes com kanamicina (Tabela 2) indicaram que as estirpes de *B. japonicum* isoladas dos cerrados toleraram, em sua maioria (68%) níveis de 20,0 $\mu$ g/ml, resistência mais alta que a maioria das estirpes comerciais (Tabela 1). Os testes sorológicos (Tabela 3) indicaram tendência das estirpes de diferentes sorogrupos a elevar seus níveis de tolerância apenas de 10,0 para 20,0 $\mu$ g/ml. As estirpes de *Bradyrhizobium* sp, independentemente de cerrado virgem ou cultivado apresentaram resistência semelhante aos das estirpes comerciais (Figura 1 e Tabela 1) e das estirpes de *B. japonicum*.

**Tabela 3 - Identificação sorológico e resistência à tetraciclina, kanamicina e cloranfenicol de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas dos cerrados.**

**Símbolos:** (a) - Estirpes de *B. japonicum* de 6 diferentes sorogrupos os quais foram encontrados nos cerrados. Isolamento de sorogrupo 29W, 587, 566 foram encontrados em todas as regiões do cerrado enquanto CB1809 somente foi isolado de Brasília e Uberaba, 965 de Brasília e Araxá e 532c foi isolado de Uberaba e só uma estirpe de Araxá; (b) Resistência indicada pelo nível de antibiótico onde houve crescimento no meio extrato de levedura-manitol (YMA); (c) - SR - Sem reação: estirpes com características antigenicas diferentes dos antisoros utilizados.

| Antibiótico<br>testado | Estirpe<br>(a) | Níveis de<br>resistência<br>( $\mu$ g/ml) | Nº de iso-<br>lamentos iden-<br>tificados | Níveis de antibióticos ( $\mu$ g/ml) |   |    |    |    |    |    |     |
|------------------------|----------------|---|---|--------------------------------------|---|----|----|----|----|----|-----|
|                        |                |   |   | Nº de estirpes-tolerantes (b)        |   |    |    |    |    |    |     |
|                        |                |   |   | 1                                    | 2 | 5  | 10 | 20 | 40 | 80 | 160 |
| Tetraciclina           | 29W            | 40  | 73  |                                      |   | 11 | 58 | 9  |    |    |     |
|                        | 587            | 40  | 68  |                                      |   | 3  | 50 | 14 | 1  |    |     |
|                        | 566            | 40  | 24  |                                      | 2 | 1  | 20 | 1  |    |    |     |
|                        | 965            | 20  | 1   |                                      |   | 1  |    |    |    |    |     |
|                        | CB1809         | 40  | 2   |                                      |   | 2  |    |    |    |    |     |
|                        | 532c           | 20  | 5   |                                      | 1 | 2  | 2  |    |    |    |     |
| Kanamicina             | SR(c)          | 20  | 15  |                                      |   | 1  |    | 3  |    |    |     |
|                        | 29W            | 10  | 65  |                                      | 1 | 2  | 10 | 45 | 6  |    |     |
|                        | 587            | 10  | 63  |                                      | 2 | 12 | 43 | 5  |    |    |     |
|                        | 566            | 10  | 22  |                                      | 1 | 5  | 14 | 3  |    |    |     |
|                        | 965            | 20  | 2   |                                      |   | 1  |    |    |    |    |     |
|                        | CB1809         | 20  | 2   |                                      |   | 1  |    |    |    |    |     |
| Cloranfenicol          | 532c           | 10  | 3   |                                      | 1 | 1  | 1  |    |    |    |     |
|                        | SR(c)          | 10  | 14  |                                      | 2 | 10 | 2  |    |    |    |     |
|                        | 29W            | 320                                       | 52  |                                      |   |    | 3  | 12 | 25 | 6  |     |
|                        | 587            | 320                                       | 43  |                                      |   |    | 2  | 7  | 21 | 9  |     |
|                        | 566            | 160                                       | 9   |                                      |   |    | 4  |    | 2  |    |     |
|                        | 965            | 160                                       | 2   |                                      |   |    | 1  |    |    |    |     |
| Cloranfenicol          | CB1809         | 160                                       | 1   |                                      |   |    |    |    |    |    |     |
|                        | 532c           | 160                                       | 2   |                                      |   |    |    |    |    |    |     |
|                        | SR(c)          | 160                                       | 13  |                                      |   |    | 1  | 2  | 4  | 3  |     |

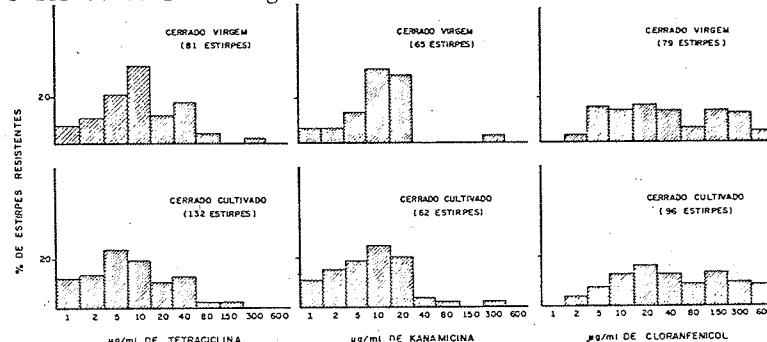
A resistência ao cloranfenicol foi mais alta nas estirpes de *B. japonicum* do que nas de *Bradyrhizobium* sp (Tabela 1). A maioria das estirpes (71%) de *B. japonicum* isoladas dos cerrados apresentaram-se resistentes a níveis de 320,0 $\mu$ g/ml de cloranfenicol (Tabela 2). As estirpes comerciais *B. japonicum*, 29W e 587, hoje utilizadas como inoculantes, suportaram níveis similares de 320,0 $\mu$ g/ml, mas as demais estirpes situaram-se na faixa de 160,0 $\mu$ g/ml (Tabela 1). A relação entre caracterização sorológica e níveis de tolerância ao antibiótico das estirpes do cerrado (Tabela 3) não sugere modificações na resistência ao cloranfenicol. Dentre as estirpes de *Bradyrhizobium* sp de solos de cerrado cultivado, 56% foram tolerantes a níveis iguais ou superiores a 40,0 $\mu$ g/ml de cloranfenicol e dentre as estirpes isoladas de cerrado virgem, 52% foram tolerantes aos mesmos níveis. Estas estirpes distribuiram-se irregularmente nas fixas de 5,0 a 600,0 $\mu$ g/ml do antibiótico (Figura 1). As estirpes comerciais indicadas para o gênero *Stylosanthes* apresentaram também tolerância nas mesmas faixas (Tabela 1). Comparando-se a resistência aos três antibióticos (Tabela 1) observa-se uma certa coincidência nas estirpes de *Bradyrhizobium* sp, sendo que as estirpes CB756 e CIAT316 apresentaram resistência mais elevada aos 3 antibióticos em relação as demais estirpes.

Os níveis de resistência a tetraciclina, kanamicina e cloranfenicol encontrados entre as estirpes comerciais, estirpes de *B. japonicum* e *Bradyrhizobium* sp de *Stylosanthes* provenientes tanto de cerrado virgem como cultivado foram semelhantes aos descritos na literatura, com apenas ligeira elevação da resistência ao cloranfenicol.

Em outros trabalhos com a estreptomicina (17) foi observado que as condições de

cerrado cultivado parecem favorecer a incidência de estirpes de *Bradyrhizobium* sp resistentes a este antibiótico. Inúmeras são as evidências de que actinomicetos produzem antibióticos sob determinadas condições no solo (7, 20). Esses antibióticos, uma vez produzidos, poderiam determinar efeitos biológicos no solo. Este efeito se verifica na redução de saprófitas e patógenos (7, 15, 20), ou mesmo sobre o *Rhizobium*, prejudicando a nodulação e o estabelecimento de leguminosas (9).

**Figura 1** - Frequência de resistência a antibióticos em estirpes de *Bradyrhizobium* de *Stylosanthes* sp isoladas de solos de cerrado virgem e cultivado.



Porém, os antibióticos no solo podem ser inativados, tanto quimicamente como degradados biológicamente (13) ou adsorvidos a argilas minerais ou humus (12, 19). Argilas como montmorilonita adsorvem tenazmente antibióticos básicos (estreptomicina, kanamicina), anfotéricos (terramicina, tetraciclina), ácidos (penicilina) e neutros (cloranfenicol) (12, 14), mas argilas como vermiculita, ilita e caulinita adsorvem moderadamente e em graus variados somente antibióticos básicos e anfotéricos, especialmente os básicos, que também são liberados em maior grau dessas argilas (12, 14). Os antibióticos neutros (19) como o cloranfenicol são pouco solúveis em água e por isso fracamente adsorvidos a argilas especialmente do tipo de caulinita. Os antibióticos básicos e anfotéricos solúveis em água são adsorvidos quantitativamente a argilas e mais facilmente liberados por tampões adequados. Em solos cauliníticos, o poder de adsorção da tetraciclina é maior que o da Kanamicina e esta, por sua vez, maior que da estreptomicina (12). Portanto, a liberação da estreptomicina dessas argilas ocorre mais facilmente que a da kanamicina e esta mais do que da tetraciclina.

A análise mineralógica dos solos de cerrados indica que o componente essencial da fração argila é a caulinita (16). Portanto, nesses solos, antibióticos básicos e anfotéricos produzidos poderiam estar sendo adsorvidos e os antibióticos básicos teriam sua liberação favorecida. Estes dados poderiam explicar a alta incidência de estirpes resistentes à estreptomicina presentes nos cerrados. Em relação à kanamicina, o pequeno aumento na tolerância de estirpes de *Bradyrhizobium japonicum* isoladas dos cerrados (10,0µg/ml para 20,0µg/ml) teria um valor relativo e pouco consistente quando comparado com o aumento observado com a estreptomicina (10,0µg/ml para 80,0µg/ml) (18).

As condições ambientais tais como pH e textura do solo podem influenciar os padrões de resistência natural a antibióticos (11). Nos resultados aqui apresentados, outros fatores parecem interferir na produção ou atividades desses antibióticos, pois não ocorreu variação significativa nos níveis de resistência a antibióticos entre as estirpes de *Bradyrhizobium* sp de solos de cerrado virgem e cultivado, fato observado com a estreptomicina, cuja produção e atividade parecem ser favorecidas pelo manejo do solo e elevação do pH pela calagem. Essas evidências embasam a hipótese de que os antibióticos podem ocorrer naturalmente e estar biologicamente ativos como resultado da somatória de forças ou fatores ambientais que podem se encontrar balanceados em determinado momento em seus sítios de produção. A partir dos resultados aqui apresentados, pode-se concluir que a resistência das estirpes de *Bradyrhizobium*, à tetraciclina, kanamicina e

cloranfenicol, apesar de mais elevada que aquela indicada pela literatura, não parece ser uma característica que determine vantagens competitivas sob condições de solo de cerrado, enquanto que a resistência a estreptomicina favoreceu a sobrevivência e a competitividade dessas estirpes no nodulação de leguminosas em solos de cerrado (5, 18).

### Referências Bibliográficas

1. Baldani, V.L.D. & Dobereiner, J. - Host-plant specificity in the infection of cereals with *Azospirillum* spp. *Soil Biol. Biochem.*, 12:433-439, 1980.
2. Brown, M.E. - Stimulation of streptomycin resistant bacteria in the rhizosphere of leguminous plants. *J. Gen. Microbiol.*, 24:369-377, 1961.
3. Coelho, R.R.R. & Drozdowicz, A. - The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 15:459-473, 1979.
4. Cole, M.A. & Elkan, G.H. - Multiple antibiotic resistance in *Rhizobium japonicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 37:867-870, 1979.
5. Dobereiner, J.; Scotti, M.R.M.M.L. & Sá, N.M.H. - Resistance to streptomycin of *Rhizobium* isolates from Cerrado and Amazon soils. In: Gibson, D.H. & Newton, eds. - Current perspectives in nitrogen fixation. Proceeding of the Fourth International Fixation held in Canberra, Australian Academy of Science, Canberra, p.434, 1981.
6. Ericsson, H.M. & Sherris, J.C. - Antibiotic sensitivity testint; Report of an International collaborative Study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, B 217 (Suppl.):1-90, 1971.
7. Gottlieb, D. & Siminoff, P. - The production and role of antibiotics in soil. II- Chloromicetin. *Phytopathology*, 42:91-97, 1952.
8. Hagedorn, C. - Relationship of antibiotic resistance to effectiveness in *Rhizobium trifolii* populations. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43:921-925, 1979.
9. Hely, F.W.; Bergersen, F.J. & Brockwell, J. - Microbial antagonism in the rhizosphere as a fator in the failure of inoculation of subterraneum clover. *Aust. J. Agric. Res.*, 8:24-44, 1957.
10. Josey, D.P.; Beynon, J.L.; Johnston, A.W.B. & Beringer, J.E. - Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *J. Appl. Bacteriol.*, 46:343-350, 1979.
11. Mahler, R.L. & Bezdicek, D.F. - Diversity of *Rhizobium leguminosarum* in Palouse of Eastern Washington. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:780-782, 1978.
12. Pinck, L.A.; Holton, W.F.; Allison, F.E. - Antibiotics in Soils. I- Physicochemical studies of antibiotic. Clay complexes. *Soil Sci.*, 91:22-28, 1961.
13. Pramer, D. - The persistance and biological effects of antibiotics in soil. *Appl. Microbiol.*, 6:221-224, 1958.
14. Pramer, D. & Starkey, R.L. - Determination of streptomycin in soil and the effect of soil colloidal material on its activity. *Soil Sci.*, 94:48-54, 1962.
15. Rangaswami, G. & Vidyasekaran, P. - Antibiotic production by *Streptomyces* sp. in corn rhizosphere. *Phytopatology*, 53:995-997, 1963.
16. Rodrigues, T.E. & Klamt, E. - Mineralogia e genese de uma sequência de solos do Distrito Federal. *Rev. Bras. Cien. Solo*, 2:132-139, 1978.
17. Sá, N.M.H.; Scotti, M.R.M.L.; Vargas, M.A.T.; Dobereiner, J. - Resistência natural à estreptomicina e eficiência de estirpes de *Rhizobium* nativas nos cerrados associadas a *Stylosanthes*. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, 18:213-218, 1983.
18. Scotti, M.R.M.M.L.; Sá, N.M.H.; Vargas, M.A.T. & Dobereiner, J. - Streptomycin resistance of *Rhizobium* isolates from Brazilian cerrados. *An. Acad. Bras. Cien.*, 54:733-738, 1982a.
19. Soulides, D.A. - Antibiotics in soils. VII- Production of Streptomycin and tetracyclines in soil. *Soil Sci.*, 100:200-206, 1965.
20. Szabó, I.; Benedek, A. & Barabas, G. - Possible role of streptomycin released from spore cell wall of *Streptomyces griseus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:438-440, 1985.
21. Vicent, J.M. - A manual for the practical study at root nodule bacteria. Oxford, Blackwell, 1970.

## EFEITO DE EXTRATOS PROTEÍCOS DE MILHO SOBRE A PRODUÇÃO DE AFLATOXINA B

Jefferson L. da S. Costa

EMBRAPA/CNPAP

Caixa Postal 179

74000 Goiânia GO, Brasil

Ajjamada C. Kushalappa

Plant Science Department, MacDonald College  
of McGill University, Ste Anne de Bellevue,  
Province Quebec, H9 X 100, Canadá

& Acelino C. Alfenas

Universidade Federal de Viçosa

Deptº de Fitopatologia

36570 Viçosa MG, Brasil

### Resumo

Testou-se o efeito de extratos proteicos de milho à base de NaCl 5% sobre a produção de aflatoxina B, em meio de cultura líquido contendo, 2% de extrato de levedura e 20% de sacarose. Dois métodos de extração foram avaliados a partir do peso seco do micélico do fungo *Aspergillus flavus* e da quantidade de aflatoxina B produzida. Os extratos proteicos das três variedades testadas estimularam o crescimento micelial do fungo. Obteve-se uma maior concentração proteica nos extratos previamente tratados com acetona. Contudo, os dois métodos se mostraram igualmente viáveis como instrumento na diferenciação varietal do milho, caracterizando a suscetibilidade de "Pipoca Americana" com altos níveis de aflatoxina produzida. "Centralmex N" e "Centralmex O<sub>2</sub>" apresentaram uma menor produção de aflatoxina que o controle. Os resultados sugerem que a composição proteica do milho pode apresentar elementos tanto eliciadores como inibidores à produção de aflatoxina B.

### Summary

#### *Effect of corn proteic extracts on aflatoxin B production*

The NaCl 5% corn proteic extracts were tested as to their effects on the production of aflatoxin B in a liquid media containing yeast extract 2% and sucrose 20%. Two methods of extraction were evaluated by the dried weight of *Aspergillus flavus* micelium and amounts of aflatoxin B produced. The corn proteic extracts of the three varieties tested in this assay stimulated fungus micelial growth. The highest concentration of protein was obtained in extracts treated with acetone. Both methods were efficient to quality corn varietal differences, characterizing the susceptibility of "Pipoca Americana" with the highest levels of aflatoxin produced. "Centralmex N" and "Centralmex O<sub>2</sub>" produced lower aflatoxin B than the control. The results suggest that the corn proteical composition may have elements which are elicitors as well as inhibitors to aflatoxin B production.

## Introdução

As aflatoxinas são produtos metabólicos carcinogênicos produzidos por alguns fungos do gênero *Aspergillus* (2), que aparecem contaminando uma série de produtos alimentícios no Brasil, dentre os quais o milho (7,8). Devido a sua alta toxicidade o assunto tem sido motivo de considerável interesse por parte de vários pesquisadores (12). Numerosos estudos evidenciam que a habilidade em produzir esta toxina varia de linhagem para linhagem (10). Diferenças varietais quanto à produção de aflatoxina em milho já foram observadas por diversos autores (3, 4, 9, 11, 14). A elucidação da natureza química dos fatores responsáveis por essas diferenças, podem auxiliar os geneticistas na obtenção de variedades com características genéticas favoráveis à resistência a produção de aflatoxina (13). O objetivo deste trabalho foi desenvolver e testar um método de extração proteíca que possa ser utilizado em testes de diferenciação varietal.

## Material e Métodos

Testou-se o efeito de extratos proteicos à base de NaCl 5% obtidos dos genótipos de milho "Pipoca Americana", "Centralmex O<sub>2</sub>" e "Centralmex N", respectivamente suscetível, medianamente resistente e resistente à infecção por *A. flavus*, sobre a produção de aflatoxina B, em meio de cultura líquido, contendo 2% de extrato de levedura e 20% de sacarose.

As amostras de milho foram trituradas em moinho Ika Universal Muhle e passadas em peneira de 10 mesh para homogeneização. O farelo foi então submetido a dois métodos de extração proteíca à base de NaCl 5%.

Em um dos métodos, as amostras foram tratadas com acetona a -18°C (2 ml de acetona/g de farelo), sob agitação constante por 20 minutos. À seguir, o material foi filtrado em papel de filtro Whatman nº 1, com o auxílio de um funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo. Após a filtragem, o farelo seco foi coletado e misturado a uma solução extratora de NaCl a 5%, na proporção de 200mg/ml por 12 horas a 5°C, sob agitação manual periódica. As amostras foram centrifugadas a 12.500 g por 60 minutos, a fim de se obter o extrato proteíco livre de detritos. O sobrenadante recolhido, constituindo o extrato proteíco, foi adicionado ao meio líquido na proporção de 5ml por 50ml de meio. O outro método consistiu na extração direta com NaCl 5% pelo mesmo processo descrito, excetuando-se o tratamento com acetona a -18°C.

Os frascos, contendo os extratos proteicos e 50ml do meio líquido, foram inoculados com a cultura NRRL 6412 de *A. flavus* e incubados por sete dias a 28°C. O controle foi feito com o cultivo do fungo em frascos contendo 5ml da solução de NaCl 5% adicionada ao meio líquido.

A avaliação, com base em quatro determinações foi efetuada estabelecendo-se o peso seco do micélio e analisando-se o teor de aflatoxina B produzida. Utilizou-se duas amostras de cada genótipo de milho por repetição.

O conteúdo proteíco de cada amostra foi estimado pelo método de Bradford, descrito por Alfenas (1). Para isto, uma curva padrão foi determinada, utilizando-se albumina bovina cristalizada (Sigma) como padrão e azul-de-Comassie G 250 ("Bio Rad Protein Assay") como corante. As soluções de albumina foram preparadas nas concentrações de 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 µg por ml de solução de NaCl 5%. Cinco ml do reagente diluído (1:4) foram misturados a 0,1ml das amostras-padrão em tubos de ensaio. Posteriormente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro Shimadzu U.V. 150-02 a 595nm. Dos resultados obtidos, calculou-se a sua equação de regressão em  $Y = 85,83 A + 20,26$ , em que Y é a quantidade de proteína em micrograma por mililitro, e A a absorbância a 595nm. A A<sub>595</sub> das amostras, contendo os extratos proteicos obtidos do milho, foi medida, e a concentração proteíca foi estimada pela equação previamente determinada.

A determinação quantitativa da aflatoxina B, produzida em cada frasco contendo 50ml de meio líquido, foi feita pelo método descrito por Nakamura e Yokoya (10). Para isso, extraiu-se a toxina com cinco lavagens de 25ml de clorofórmio em funil de separação. Concentrou-se em rotovapor a vácuo o extrato clorofórmico para 50ml

(solução A); diluiu-se 1ml desta para 50ml (solução B) e 5ml da solução B para 10ml (solução C). Aplicou-se a solução C em placas de cromatografia de camada delgada (DC. Fertigplatten, Kieselgel 60,20 x 20cm) nas seguintes quantidades: 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 12,5ml, usando-se como fase móvel éter dietílico e depois clorofórmio: metanol (95:5). Calculou-se a quantidade de aflatoxina em miligramas utilizando-se a fórmula:  $A = \frac{0,4 \times 10^{-3} \times V}{V'}$

em que:

$A$ = quantidade de aflatoxina B em miligramas;

$V$ = o quociente entre o produto de volumes totais (em ml) de cada diluição e o produto dos volumes (em ml) transferidos para serem diluídos. Para o caso do extrato clorofórmico:

$V$ = produto do volume total das soluções A, B, C (150, 50 e 10ml) dividido pelo produto dos volumes transferidos da solução A e B (1 e 5ml);

$V'$ = menor volume em que se observa a fluorescência;

0,4= constante referente à concentração mínima de aflatoxina em mg, capaz de emitir fluorescência visível na placa de cromatografia.

Para a identificação das manchas fluorescentes detectadas nos extratos das amostras testadas, utilizou-se no desenvolvimento de todos os cromatogramas, um padrão de aflatoxina B, fornecido pelo Northern Regional Research Laboratory, Peoria, Illinois.

## Resultados e Discussão

Em ensaios preliminares, utilizando dois genótipos de milho, um resistente e outro suscetível à *A. flavus*, verificou-se que os extratos à base de água, álcool 70% e  $\text{NaHCO}_3$  0,004 M pH 7,0, processados apropriadamente e incorporados ao meio líquido, não permitiram observar nenhuma diferença significativa quanto a produção de aflatoxina. Entretanto os extratos desses genótipos, à base de  $\text{NaCl}$  5%, diferiram significativamente, com o suscetível permitindo a produção dos mais altos níveis de aflatoxina.

O uso de extratos proteicos de milho à base de  $\text{NaCl}$  5%, já vinha sendo efetuado por alguns autores na tentativa de se obter diferenças varietais quanto à produção de aflatoxina B (9, 13). Neste ensaio, os extratos proteicos de todas as variedades testadas estimularam o crescimento micelial de *A. flavus*, indicando a efetividade do milho como substrato natural para o desenvolvimento deste. Os dois métodos de extração proteica, não diferiram estatisticamente mostrando-se igualmente viáveis para estudos que visem detectar diferenças varietais em milho quanto à infecção por *Aspergillus flavus*, a partir do peso seco do micélio e teor de aflatoxina produzida (Tabela 1). Os resultados mostram a evidente suscetibilidade de "Pipoca Americana", que além de permitir um ótimo desenvolvimento do fungo, registrando a obtenção do maior peso seco de micelio, também possibilitou a produção de aflatoxina em níveis superiores ao próprio controle. Esse comportamento contrasta com os genótipos "Centralmex N" e "Centralmex O<sub>2</sub>", que apresentaram, quando comparadas com o controle, uma menor produção de aflatoxina B. Esses dados sugerem portanto, que a composição proteica do milho tanto pode conter elementos eliciadores como inibidores à produção de aflatoxina, sem contudo, inibir o crescimento micelial do fungo. Não foi possível detectar diferenças significativas entre os genótipos "Centralmex N" e "Centralmex O<sub>2</sub>", em nenhum dos parâmetros avaliados neste ensaio.

A concentração proteica nos extratos de "Centralmex N", "Pipoca Americana" e "Centralmex O<sub>2</sub>" previamente tratados com acetona fria foi superior aos não tratados, sendo estimada respectivamente em 178, 189 e 201  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , para o primeiro e em 124, 132 e 148  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , para o segundo. Entretanto, a razão dos métodos de extração não diferem significativamente quanto à produção de aflatoxina (Tabela 1) pode ser atribuída ao fato, de que a quantidade de proteína extraída, apenas em  $\text{NaCl}$  5%, já ser suficiente para a produção dos mais elevados níveis de aflatoxina possíveis, nas condições de cultivo a que o fungo foi submetido. Assim, é provável que o método de extração em acetona, e posteriormente  $\text{NaCl}$  5%, tenha extraído proteínas supérfluas ou desnecessárias ao processo de produção de aflatoxina B.

De todos os grupos de proteínas existentes em grão de milho, King & Wallin (5) reportam em sua revisão que a globulina, uma proteína altamente solúvel em NaCl, é a única conhecida a afetar diretamente a produção ou inibição de aflatoxina. Nagarajan & Bhat (9) mencionam ainda, que essa globulina possui um baixo peso molecular e que provavelmente é um fator de inibição de aflatoxina em certas variedades. Considerando as observações feitas neste trabalho, o método de extração proteica desenvolvido e testado, poderá ser empregado com relativa facilidade, em futuros trabalhos que se fazem necessários no estudo da constituição proteica de variedades de milho resistentes à *A. flavus*, bem como na caracterização fisiológica de isolados do fungo existentes no Brasil.

#### Referências Bibliográficas

- Alfenas, A.C. - Virulence and isoenzyme patterns of *Cryphonectria cubensis* (BRUNER) HODGES causal agent of the eucalyptus canker. University of Toronto, Canadá, 1983. (Tese Ph.D.).
- Diener, U.L. & Davis, N.D. - Aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. In: Golabtch, L.A., ed. Aflatoxin. New York, Academic Press, p.13-54, 1969.
- King, S.B. & Scott, G.E. - Screening maize for resistance to kernel infection by *Aspergillus flavus*. *Phytopath.*, 71:231, 1981.
- King, S.B. & Scott, G.E. - Field inoculation techniques to evaluate maize for reaction to kernel infection by *Aspergillus flavus*. *Phytopath.*, 72:782-785, 1982.
- King, S.B. & Wallin, J.R. - Methods for screening corn for resistance to kernel infection and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. In: - Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Southern Cooperative Series Bulletin nº 279, p.77-80, 1983.
- Krenzer, E. - Aflatoxins in corn. *Crops and Soi. Magaz.*, 332:1-32, 1979.
- Kushalappa, A.C. - Aflatoxin-producing fungi of *Aspergillus flavus* group in stored corn and beans in the farms of Minas Gerais State. *Fitop. Bras.*, 4:391-395, 1979.
- Lin, M.T.; Najar, T.S.; França, P.S. & Rottman, C. Incidence of aflatoxigenic fungi on corn. *Fitopatologia (Lima)* 11:21, 1976. (Abstract).
- Nagarajan, V. & Bhat, R.V. - Factor responsible for varietal differences in aflatoxin production in maize. *J. Agric. Food Chem.*, 20:911-914, 1981.
- Nakamura, H. & Yokota, F. - Comparação da capacidade de sintetizar aflatoxina entre vários fungos do gênero *Aspergillus*. *Rev. Bras. de Tecnol.*, 1:81-96, 1970.
- Rivera-Canales, J.M. - Resistance of maize kernels to decay by *Aspergillus flavus*. Anes, Iowa State University, 1981. (Tese M.Sc., Abstract).
- Santos, J.A. - Aflatoxina e câncer hepático. *Pesq. Agropec. Bras.*, 1:75-85, 1966.
- Widstrom, N.W. & Zuber, M.S. - Sources and mechanisms of genetic control in the plant. In: - Aflatoxin and *Aspergillus flavus* in corn. Southern Cooperative Series Bulletin nº 279, p.72-76, 1983.
- Zuber, M.S.; Calvert, W.F.; Kwolek, W.F.; Lillehoj, E.B.; Kang, M.S. - Aflatoxin B<sub>1</sub> production in an eight-line diallel of *Zea mays* infected with *Aspergillus flavus*. *Phytopath.*, 68:1346-1349, 1978.

**Tabela 1** - Efeito de extratos de milho a base de NaCl 5% sobre o peso seco do micélio e aflatoxina B produzidos por *A. flavus*.

**Símbolos:** \*Valores seguidos por letras diferentes são considerados significativamente diferentes, pelo teste de Tukey ( $P=0,05$ ). Letras maiúsculas na horizontal e minúsculas na vertical. Os dados são valores médios de quatro determinações.

| Variedades       | Extratos  |                               |                   |                  |
|------------------|-----------|-------------------------------|-------------------|------------------|
|                  | NaCl 5%   |                               | Acetona + NaCl 5% |                  |
|                  | Peso (mg) | Toxina <sup>3</sup> (mg/50ml) | Peso (mg)         | Toxina (mg/50ml) |
| Centralmex N     | 1450 bA*  | 0,436 cA                      | 1440 bA           | 0,400 cA         |
| Centralmex O2    | 1550 bA   | 0,650 cA                      | 1375 bA           | 0,600 cA         |
| Pipoca Americana | 2000 aA   | 2,850 aA                      | 2150 aA           | 2,730 aA         |
| Controle1        | 1000 c    | 1,230 b                       | 1000 c            | 1,230 b          |
| C.V. (%)         | 5,53      | 7,1                           | 2,7               | 9,31             |

# INFLUÊNCIA DA OSCILAÇÃO DO pH NA SÍNTESE DE AMILOGLICOSIDASE POR ASPERGILLUS AWAMORI

Willibaldo Schmidell  
 Maria Cândida Reginato Facciotti  
 Beatriz Vahan Kilikian  
 Henri Aboutboul  
 & Jesus Maria Zaldivar Aguero (Bolsista FAPESP)

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

## Resumo

A síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus* sofre a influência de uma série de fatores, tais como temperatura, concentração inicial de polissacarídeo, pH etc. Em particular, o pH interfere de forma decisiva na indução à síntese da enzima, sendo que é possível imaginar-se a operação de um reator com oscilações de pH, ao invés de mantê-lo fixo. Os resultados obtidos indicam pH 5,0 como ótimo para a produção da enzima, obtendo-se uma atividade final no caldo próxima a 5.000U/l, enquanto que a pH 4,0 obteve-se apenas a metade deste valor. As oscilações de pH em torno do valor 4,0 resultaram num acréscimo de 64% na atividade final do caldo, em relação ao valor obtido quando se manteve pH fixo em 4,0. Por outro lado, as oscilações em torno do valor 5,0 reduziram em 10% a atividade enzimática final, em relação aquela obtida com pH 5,0 constante.

## Summary

*Influence of pH oscillations in amyloglucosidase production by Aspergillus awamori*

Amyloglucosidase production by *Aspergillus* is influenced by a great number of factors, such as medium composition, temperature, pH etc. In particular, the pH value exerts a decisive effect in the induction of enzyme synthesis. It is possible to consider a batch cultivation with pH cycling conditions, instead of maintaining it at a fixed value. The obtained results indicate a pH of 5.0 as the optimum value for the amyloglucosidase synthesis, with a final enzymatic activity near to 5,000U/l, while at pH 4.0 it was obtained only about half of that value. The pH oscillations around the value 4.0 resulted in an increase of 64% in the final activity, regarding the value obtained at pH fixed in 4.0. The oscillations around pH 5.0 caused, however, a decrease of 10% in the final amyloglucosidase activity, also as compared with the value obtained at pH fixed in 5.0.

## Introdução

A amiloglicosidase ou glicoamilase é a enzima que, agindo nas ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 da molécula de amido, é capaz de transformar este polissacarídeo em glicose,

para ambos os ensaios, ao longo de todo o cultivo, chegando-se a um valor final ligeiramente inferior, da ordem de 10%, para o ensaio nº 4, em que se oscilou o pH entre 4,5 e 5,5. A Tabela 1 indica, igualmente, a obtenção de valores de YA/S e da produtividade em enzima, cerca de 10% inferiores para o ensaio nº 4.

Analizando-se conjuntamente os resultados indicados na Tabela 1, pode-se concluir que, na verdade, as diferenças observadas entre os ensaios nºs 2, 3 e 4 não são muito significativas, chegando-se a valores não muito diferentes da atividade enzimática final, bem como das produtividades e dos fatores de conversão. Este aspecto é extremamente importante em termos práticos, pois significa a possibilidade de uma maior flexibilidade no controle do pH durante o processo, não havendo a necessidade de um controle rígido do mesmo em um valor fixo. Além disso, indica também uma baixa sensibilidade do sistema a uma eventual heterogeneidade do pH em um reator industrial.

A fim de se poder analisar melhor a influência do pH na síntese da amiloglicosidase, foram calculados ainda, para todos os ensaios, os valores da velocidade específica de produção da glicoamilase ( $\mu A$ ), ao longo de todo o cultivo, definida pela expressão:

$$\mu A = \frac{1}{X} \frac{dA}{dt}$$

onde:  $\mu A$  = velocidade específica de produção da amiloglicosidase (U/g.h)

$X$  = concentração celular (g/l)

$\frac{dA}{dt}$  = velocidade de produção da amiloglicosidase (U/l.h)

Os valores de  $dA/dt$  foram obtidos a partir das curvas de atividade em função do tempo, calculando-se as derivadas segundo método proposto por Le Duy & Zajic (5).

A Figura 4 indica os valores obtidos de  $\mu A$  em função do tempo para todos os ensaios.

A partir desta figura observa-se que as curvas de  $\mu A$  apresentam duas fases distintas: uma fase inicial, onde  $\mu A$  é crescente e atinge um valor máximo em aproximadamente 14 a 16 horas de cultivo, e em seguida, uma segunda fase, onde  $\mu A$  passa a exibir um comportamento decrescente, até o final do cultivo.

Pode-se observar que o início da queda de  $\mu A$  é praticamente coincidente com o instante em que o polissacarídeo se encontra totalmente hidrolisado, ou seja, quando se tem ART = AR, conforme se observa na Figura 1. Portanto, tem-se a partir

Tabela 1 - Resumo dos resultados obtidos nos cultivos descontínuos de *A. autamori* NRRL 3112.

| CARACTERÍSTICA  | ENSALIO N°    |                                      |               |                                      |
|---|---------------|--------------------------------------|---------------|--------------------------------------|
|   | 1<br>(pH 4,0) | 2<br>(pH osc.<br>entre<br>3,5 e 4,5) | 3<br>(pH 5,0) | 4<br>(pH osc.<br>entre<br>4,5 e 5,5) |
| Concentração de ART no instante inicial $t_0 = S_0$ (g/l)         | 80,2          | 81,7                                 | 83,1          | 84,8                                 |
| Concentração celular em $t_0 = X_0$ (g/l)                         | 0,42          | 0,83                                 | 0,47          | 0,37                                 |
| Atividade enzimática em $t_0 = A_0$ (U/l)                         | 15,2          | 9,6                                  | 19,6          | 18,7                                 |
| Tempo para consumo da fonte de carbono - $t_f$ (h)                | 42            | 45                                   | 42            | 45                                   |
| Concentração de ART em $t_f = S_f$ (g/l)                          | 0,77          | 1,77                                 | 0,18          | 0,19                                 |
| Concentração celular em $t_f = X_f$ (g/l)                         | 14,5          | 16,9                                 | 15,2          | 15,0                                 |
| Instante em que se atingiu a máxima atividade - $t'_{f'}$ (h)     | 44            | 45                                   | 48            | 48                                   |
| Atividade enzimática em $t'_{f'}$ - $A'_{f'}$ (U/l)               | 2480          | 4074                                 | 4864          | 4354                                 |
| Concentração de ART em $t'_{f'} = S'_{f'}$ (g/l)                  | 0,39          | 1,77                                 | 0,18          | 0,16                                 |
| Produtividade em células em $t_f$ $P_X$ (g/l.h) <sup>(1)</sup>    | 0,34          | 0,36                                 | 0,35          | 0,33                                 |
| Produtividade em enzima em $t'_{f'}$ $P_A$ (U/l.h) <sup>(2)</sup> | 56,0          | 90,3                                 | 100,9         | 90,3                                 |
| Fator de conversão substrato a células - $Y_{X/S}$ <sup>(3)</sup> | 0,18          | 0,20                                 | 0,18          | 0,17                                 |
| Fator de conversão substrato a enzima - $Y_{A/S}$ <sup>(4)</sup>  | 30,9          | 50,9                                 | 58,4          | 51,2                                 |

$$(1) P_X = \frac{X_f - X_0}{t_f}$$

$$(3) Y_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_f}$$

$$(2) P_A = \frac{A'_{f'} - A_0}{t'_{f'}}$$

$$(4) Y_{A/S} = \frac{A'_{f'} - A_0}{S_0 - S'_{f'}}$$

deste instante, o microrganismo crescendo em presença apenas de glicose no meio, que passa a exercer um efeito repressivo significativo. Como resultado deste efeito, e também devido à limitação pelo oxigênio, que passa a atingir a partir de então, valores inferiores a 10%, obtém-se portanto, um decréscimo acentuado da velocidade específica de produção da amiloglicosidase.

Com relação à influência do pH nesta segunda etapa do cultivo, observa-se através da Figura 4, que os valores de  $\mu A$  obtidos no ensaio nº 3 (pH 5,0) foram nitidamente superiores aos ensaios nºs 1 e 2 (pH 4,0 e pH oscilando entre 3,5 e 4,5, respectivamente) e praticamente coincidentes com os valores obtidos no ensaio nº 4 (pH oscilando entre 4,5 e 5,5), apresentando alguma diferença apenas no final do cultivo. Deve-se observar também que, os valores de  $\mu A$  para o ensaio com oscilação de pH ao redor de 4,0 (ensaio nº 2) foram sempre superiores em relação ao ensaio a pH 4,0 constante (ensaio nº 1).

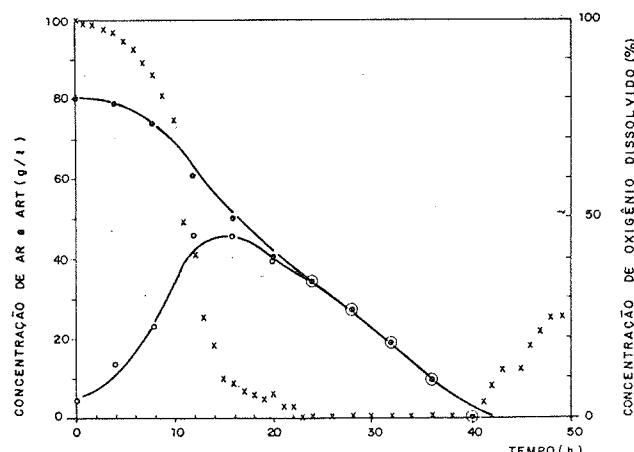
No tocante à primeira etapa das curvas de  $\mu A$ , em que se tem  $\mu A$  crescente, observa-se um fato bastante interessante: os valores de  $\mu A$  obtidos no ensaio nº 2, isto é, com pH oscilando entre 3,5 e 4,5, foram nitidamente superiores aos obtidos em todas as outras condições de pH, obtendo-se valores praticamente coincidentes para aqueles ensaios.

É possível que se possa atribuir tal superioridade nos valores de  $\mu A$ , à realização de oscilações mais frequentes de pH no ensaio nº 2, conforme se pode observar na figura 3, ao se comparar os perfis de pH dos ensaios nºs 2 e 4.

Cumpre lembrar que a frequência das oscilações de pH era ditada pelo próprio andamento do cultivo. Portanto, é possível imaginar ainda, a realização de ensaios com oscilações forçadas, isto é, mais frequentes, ao longo de todo o cultivo, buscando desta maneira a obtenção de valores mais elevados de  $\mu A$ .

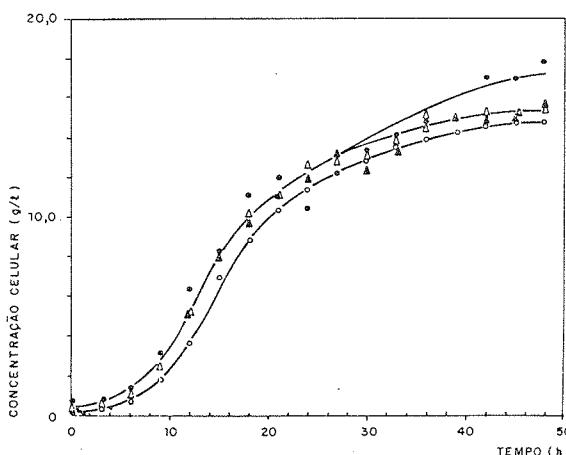
Tais considerações indicam, portanto, uma influência

**Figura 1** - Concentração de AR(o), ART(●) e oxigênio dissolvido (x) em função do tempo de cultivo durante o ensaio nº 1 (pH=4,0).



**Figura 2** - Concentração celular em função do tempo de cultivo

Símbolos: (o) Ensaio nº 1 (pH=4,0); (●) Ensaio nº 2 (pH oscilando entre 3,5 e 4,5); ( $\Delta$ ) Ensaio nº 3 (ph=5,0); ( $\blacktriangle$ ) Ensaio nº 4 (pH oscilando entre 4,5 e 5,5)

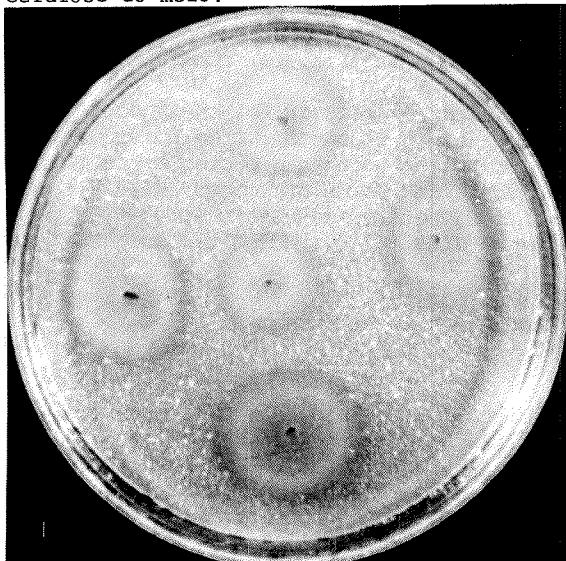


**Tamanho da colônia:** Para se conseguir um tamanho de colônia adequado estudou-se: 1) a concentração de citrato de sódio a ser adicionada ao meio de cultura para reduzir o crescimento da colônia a um diâmetro tal que permitisse inocular e medir a capacidade celulolítica de cinco colônias por placa. Segundo os dados da tabela 1 a concentração mais efetiva para o redutor de colônias foi a de 10 mM. O citrato de sódio na concentração de 5 mM não reduziu o crescimento das colônias impedindo assim visualizar a presença do halo. 2) temperatura e período de tempo de incubação que permitissem obter colônias de tamanho adequado. Os dados da tabela 1 indicam que as colônias incubadas durante três dias desenvolveram-se muito pouco e portanto a margem de erro na medição das mesmas foi muito grande. Com dez dias de incubação as placas apresentaram ressecamento do ágar, não sendo possível uma medição correta do diâmetro das colônias. Porém, colônias de cinco a sete dias apresentaram tamanho razoável e ideal nas condições utilizadas para visualização do halo.

**Presença de halo de degradação e índice de atividade enzimática:** As colônias com três dias de incubação além de serem muito pequenas não apresentaram halo de degradação de celulose. Com dez dias de incubação houve ressecamento do meio de cultivo, não sendo possível uma medição correta do halo. As colônias incubadas por cinco e sete dias apresentaram halo de degradação visível, sendo que as cultivadas durante cinco dias a 42°C apresentaram os maiores índices de atividade enzimática (tabela 2).

**Choque térmico:** A aplicação de choque térmico (50°C) por 16 horas, auxilia a revelação do halo de degradação da celulose. Segundo Montenecourt & Eveleigh (3) o choque térmico favorece uma hidrólise mais rápida da celulose, permitindo a seleção de colônias produtoras de enzimas celulolíticas termoestáveis. Entretanto a temperatura de 50°C conduz à paralisação do crescimento de *Trichoderma reesei*. A emergência do halo claro de hidrólise deve-se ao efeito combinado do aumento da atividade celulolítica e de uma consequente inibição do crescimento do fungo. Segundo os autores, isto poderia ser devido à liberação de celulases das hifas localizadas nos bordos das colônias por autólise resultante do tratamento térmico. Isto não parece ocorrer em *T. reesei* cujos isolados permanecem viáveis após o tratamento com calor. O mesmo fenômeno ocorre em *Humicola* sp de modo que o halo se

**Figura 1** - Placa de Petri inoculada com *Humicola* sp, durante cinco dias, após choque térmico e corada pelo método desenvolvido no presente trabalho. Visualiza-se, nitidamente, a presença do halo claro em volta das colônias indicando a exportação de enzimas celulolíticas extracelulares, que hidrolizaram a celulose do meio.



**Tabela 2** - Índice de atividades enzimática de *Humicola* sp em 4 meios de cultura em diferentes tempos e temperaturas de incubação (média de 5 repetições).

**Símbolos:** - Não foi detectado produção de halo de degradação; \* Não houve praticamente inibição do crescimento ocorrendo junção das colônias, o que impidiu a medição do índice de atividade enzimática.

| Temperatura<br>Meio | 28°C |   |      |      | 42°C |   |   |      |
|---------------------|------|---|------|------|------|---|---|------|
|                     | 1    | 2 | 3    | 4    | 1    | 2 | 3 | 4    |
| Dias                |      |   |      |      |      |   |   |      |
| 5                   | *    | - | 1,17 | 1,22 | *    | - | * | 1,28 |
| 7                   | *    | - | 1,05 | 1,13 | *    | - | * | 1,05 |

manifesta provavelmente em função de uma maior atividade da enzima já difundida no meio quando em temperatura mais adequada. Entretanto, serão necessários mais estudos para esclarecer a ação do choque térmico favorecendo o aparecimento do halo.

### Conclusões

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que o meio mais adequado para visualização do halo de degradação da celulose em *Humicola* sp deve conter KCl, extrato de malte e citrato de sódio 10 mM; o período e temperatura de incubação favoráveis foram cinco dias e 42°C respectivamente com posterior choque térmico a 50°C durante 16 horas seguindo-se aplicação de corante para melhor visualização do halo de degradação. A técnica aqui descrita permite a visualização de um halo de degradação de celulose, ao redor das colônias comprovando a capacidade do *Humicola* sp em exportar celulases.

### Agradecimentos

Os autores agradecem ao M.Sc. Rolf A. Prade pelas informações fornecidas a respeito da técnica de coloração utilizada no presente trabalho. Agradecimentos são também devidos à FINEP (Convênio nº 54.0805.00) e ao CNPq por bolsa de estudo concedida a um dos autores (E.N.).

### Referências Bibliográficas

1. Chaves, V.M.G. - Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa, V.F.V., 1982 (Tese de Mestrado).
2. Mandels, M. - Growth and cellulase production by *Trichoderma*, In: Bailey M., T.M. Enari and M. Linko, Symposium on the enzymatic hydrolysis of cellulose. The Finnish National Fund for Research and Development (SITRA), Helsinki, Finland., 1975. p.81-109, 1975.
3. Montenecourt, B.S. & Eveleigh, D.E. - Semiquantitative plate assay for determination of cellulase production by *Trichoderma viride*. Appl. Environ. Microbiol., 33:178-183, 1977.
4. Sharma, P.; Pajni, S.; Dhillon, N.; Vadehra, D.V.; Dube, D.K. - Limitations of the congo-red staining techniques for the detection of cellulolytic activities. Biotech. Letters, 8:579-580, 1986.
5. Tansey, M.R. - Agar diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. Archiv. fur Mikrobiologie, 77:1-11, 1971.
6. Teather, R.M. & Wood, P.J. - Use of congo red polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. Appl. Environ. Microbiol., 43:777-780, 1982.

## PURIFICATION OF RABBIT IgG, OBTENTION OF SHEEP ANTIRABBIT IgG AND THEIR USE IN RADIOIMMUNOASSAY OF AVIAN LEUKOSIS VIRUS-p15

Tomoko Higuchi

Hiroe Ogata

Silvio Sanches Veiga

Zélia Maria Nogueira

Deptº de Bioquímica

Instituto de Química

Caixa Postal 20780

01498 São Paulo SP, Brasil

& Júlia Maria Martins de Souza Felippe

Divisão de Vírus

Instituto Adolfo Lutz

Av. Dr. Arnaldo, 355

01246 São Paulo SP, Brasil

### Summary

Immunoglobulin from rabbit serum was purified by ammonium sulphate precipitation followed by chromatography on DEAE-cellulose and gel filtration in Sephadex G-200. The efficiency of all steps was followed by protein determination and profiles in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. Sheeps were immunized with purified IgG. The sheep anti-rabbit IgG titre was evaluated by double immunodiffusion gel plates. The system rabbit serum vs sheep anti-rabbit IgG serum was used as precipitating system in radioimmunoassay of the retrovirus immunogens, in this case, p15 of avian leukosis virus.

### Resumo

*Purificação da imunoglobulina (IgG) de coelho, obtenção de soro de carneiro Anti-IgG de coelho e aplicação em radioimunoensaio de p15 do vírus da leucose de aves.*

A imunoglobulina de coelho foi purificada por precipitação com solução saturada de sulfato de amônio seguida de cromatografia em DEAE-celulose e filtração em Sephadex G-200. A eficiência do processo foi seguida pela determinação de proteína e perfil da elektroforese em gél de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio. Carneiros foram imunizados com a IgG purificada e o título do soro de carneiro Anti-IgG de coelho foi estimado por prova de dupla difusão em gel de agar. O soro imune assim obtido mais soro normal de coelho foi empregado como sistema precipitante em radioimunoensaio dos imunógenos dos retrovírus, neste caso, p15 do vírus da leucose de aves.

### Introduction

The animal immune system response to a challenge by the antigen under appropriate conditions results in a secretion of population of antibodies from differentiated lymphocytes or plasmocytes. The antibodies are characterized by its abilities to

react specifically with the determinants groups of the antigen (epitopes) (10, 16).

Several approaches have been used to purify the immunoglobulins from serum depending on the degree of purity desired, in order to be used in serological reactions, therapy or experimental purpose. The available methods are based either on physico-chemical properties of proteins or careful separation of antibody from antigen-antibody complexes (3). Because of practical reasons, the methods based on physico-chemical properties of antibodies are more widely used. The salting out by itself is not enough to purify, requiring further steps (14).

In the present work, we are reproducing an efficient although time consuming procedure for IgG purification based on salt fractionation followed by DEAE-cellulose chromatography and filtration in Sephadex G-200 (14, 15). The purified rabbit IgG was used for sheep immunization. The sheep anti-rabbit IgG vs rabbit serum complex represented the precipitating system of radioimmunoassay. (At the time we started the immune serum obtention it was not commercially available and even now, it is not easy to get products without alteration besides being supplied in small amounts).

Initially, the radioimmunoassay (RIA) was used for hormone assays, mainly insulin. Later on, it was extended to other areas of research, particularly in the immunology of tumour viruses. Before that, for retrovirus antigen evaluation, the complement fixation assay was used, the RIA was shown to be considerably more sensitive, about 100 to 1,000 times (4). Higuchi and August (8) showed the high sensitivity of RIA in the study of competition of normal cells, purified virus suspension, productive cells and supernatant fluids in avian myeloblastosis virus system.

All retroviruses synthesize their major structural components as a precursor of 70 to 80K molecular weight polyprotein. The precursor is processed by proteases, that cleave the polyprotein to give the virion proteins. In the case of avian leukosis virus (ALV) we can distinguish the following components, named p27, p19, p15, p12 and p10. The p15 ("protein" of 15K molecular weight - nomenclature proposed by August & al. (1), is located in the carboxy-terminal of the precursor molecule, it has a remarkable proteolytic activity (17, 19).

The immunoreagents we have prepared were successfully used to assay the structural antigens of avian leukosis virus (6, 7). The immunogens were isolated from purified virus suspension by one of us (18) (J.M.M.S.F. - paper submitted to publication). Here, we are showing the studies on the immunogen p15 (not included in the above manuscript) using the prepared precipitating system.

## Material and Methods

**Protein determination** - The protein content was evaluated by assaying an aliquot of sample by Lowry & al. method (13).

**Polyacrylamide sodium dodecyl sulphate gel electrophoresis (PAGE)** - The steps of the purification procedure were followed by electrophoresis profile at 12.5% gel concentration as described elsewhere (8, 9).

**Double immunodiffusion test** - The titre of sheep anti-rabbit IgG serum was defined as the highest serum dilution giving precipitation line against purified IgG (5, 12).

**Radioimmunoassay** - The assay was carried out in a double antigen-antibody system, using antigen labelled by  $^{125}\text{I}$ odine, antibody in a dilution equivalent to its titre (8, 9, 11).

The titration reaction was carried out in a system containing: 0.03ml of normal rabbit serum diluted 1:3; 0.01ml of immune serum in serial dilution; 0.02ml of  $^{125}\text{I}$ -protein in adequate dilution to have approximately 1.0 nanogram of the labelled antigen. After completing the volume to 0.150ml with TEN buffer containing 2mg bovine serum albumin, the mixture was incubated at 37°C water bath for three hours. The second antibody 0.03ml dil 1:256 SAR (sheep anti-rabbit) was added and

the reaction left to completion by overnight incubation at 4°C. After addition of 0.05ml of cold TEN buffer, the pellet was collected by centrifugation at 3.500 x g for 20 minutes and washed once with the same buffer. The radioactivity of the pellet was measured in a gamma counter.

**Immunoglobulin purification** - The immune serum is properly diluted with cold saline solution and then precipitated with saturated ammonium sulphate solution up to 50% final saturation. The pellet was collected by centrifugation at 3.000 x g/15 minutes at 4°C. The resuspended pellet was extensively dialyzed against 20mM phosphate buffer pH 8.0 - This dialysed sample was passed through a (DEAE) diethylaminoethylcellulose column (2.0 x 25cm) eluted with 10mM potassium phosphate buffer pH 8.0. The first peak of protein, measured at 280nm absorbance was concentrated by reprecipitation with ammonium sulphate. The precipitate was dissolved in PBS (phosphate saline buffer pH 7.5) and the excess of salt was eliminated by extensive dialysis against the same buffer. The sample was then passed through Sephadex G-200 column, (4 x 42cm), eluted with 10mM phosphate saline buffer 7.8. The amount of protein was estimated by absorbance measurement at 280nm.

The steps of the purification procedure was followed by protein determination and profile in sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

**Sheep immunization** - 6.5mg of rabbit IgG dissolved in 1.0ml of PBS; added dropwise to 1.0ml of complete Freund adjuvant and carefully emulsified in a syringe. 1.0ml of emulsion was injected in the animal tail. Every two weeks, booster injections were given using the antigen suspended in the incomplete Freund adjuvant. Before each injection 10ml of blood were taken from jugular vein and antibody titre was determined in the serum (double immunodiffusion gel technique).

## Results and Discussion

Immune serum purification is done quite oftenly but usually, people do partial purification because of technical difficulties, mainly when big volumes are dealt. Due to indirect interference of serum components and in certain cases to avoid undesirable side effects, the need of purified IgG instead of whole immune serum became relevant.

In the earlier times, salt purification was done mainly with sodium sulphate. In our preliminar studies, the ammonium sulphate proved to be more efficient because of the great loss with sodium sulphate (15). In the ammonium sulphate step we got about 30.2% total protein recovery in several preparations (Table 1). In the DEAE-cellulose chromatography once it is based on charge, the first peak represent the IgG fraction (Figure 1). In this step, in the first peak there were 187.2mg of protein corresponding to 25.3% yield. The fraction after proper treatment was passed through Sephadex G-200 (Figure 2) with an average of 8.1% protein recovery. The Figure 3 represents the electrophoresis profile of fractions of different steps. To begin with, we saw more than 10 lines, surely some are aggregates and the number of components reduced in the ion exchange chromatography. The electrophoresis was carried out in the presence of the reducing agent 2-β-mercaptoethanol. The immunolectrophoresis was not done because the immunochemistry of products were out of interest.

The rabbit IgG was used to induce what we called (SAR) - sheep anti-rabbit Ig serum. In the best preparation, after three booster injections the sheep anti-rabbit serum titer was 1:256 serum dilution, determined by double immunodiffusion gel plates (Figure 4).

The application of the system rabbit serum vs sheep anti-rabbit IgG in our study was in radioimmunoassay as indicator of the presence of the complex - retrovirus antigen vs antibody. As widely known the radioimmunoassay is so far the most sensitive method for detection of antigen present in a system in which the antigen-antibody forms a soluble complex and then it is precipitated by the second antigen-antibody (rabbit serum vs anti-rabbit IgG). We use this assay to detect retrovirus antigen or its equivalents present in fibroblasts, normal cells or

infected cells. By the amount of labelled antigen in the precipitate we can measure the degree of competition of the unlabelled component in the combination with the antibody combining sites. The Table 3 represents the standard curve for p15 which can be used to calculate the presence of equivalents of p15 in a biological material, like culture fluid, cell extract or virus suspension.

We feel that the standardization of assay conditions for retrovirus proteins studies is highly relevant, we don't depend on ready-made reagents, actually there is no kits available for these particular antigens. Besides, using heterologous competition assays it is possible to measure the degree of group, type or interspecies determinants groups present in a protein (9, 11). It is truth that the assay requires the radioactive  $^{125}\text{I}$ -Na, not always available. The standardization of the precipitation system and the chance of the suppling the immunobiological reagent have been very helpful in retrovirus antigen studies.

**Table 1** - Rabbit IgG purification:  
Protein determination

Protein content determined according to Lowry et al. (1951) using bovine serum albumin (1mg/ml) as standars.

| Fraction               | mg/ml | Volume<br>(ml) | Total<br>(mg) | Yield<br>(%) |
|------------------------|-------|----------------|---------------|--------------|
| Total serum            | 52.8  | 14.0           | 739.2         | 100.0        |
| Ammonium sulphate step | 37.2  | 6.0            | 223.2         | 30.0         |
| DEAE-column peak       | 28.8  | 6.5            | 187.2         | 25.3         |
| Sephadex G-200         | 15.0  | 4.0            | 60.0          | 8.1          |

**Table 2** - Use of sheep Anti-rabbit IgG in the radioimmunoassay

The reaction was carried out as written in Material and Methods (Radioimmunoassay). The titre was 1:5,000 calculated by plotting the results in a semi-log paper.

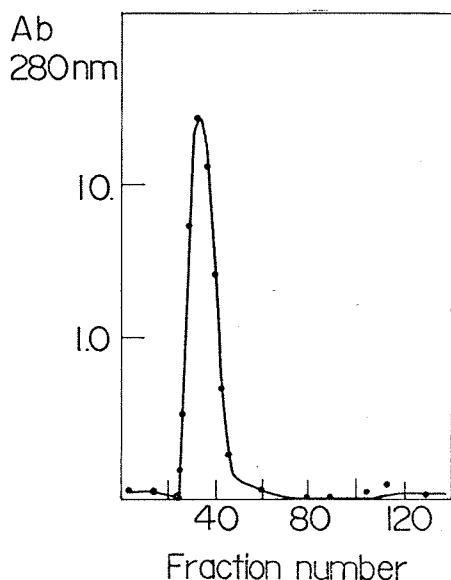
| Tube | Buffer<br>(ml) | NRS<br>(ml) | Anti-p15<br>0.02ml | $^{125}\text{I}$ -15<br>(ml) | SAR<br>(ml) | pptation<br>(%) |
|------|----------------|-------------|--------------------|------------------------------|-------------|-----------------|
| 1    | 0.130          | -           | -                  | 0.02                         | -           | -               |
| 2    | 0.07           | 0.03        | -                  | 0.02                         | 0.03        | -               |
| 3    | 0.06           | 0.03        | 1:64,000           | 0.02                         | 0.03        | 9.3             |
| 4    | 0.06           | 0.03        | 16,000             | 0.02                         | 0.03        | 19.2            |
| 5    | 0.06           | 0.03        | 4,000              | 0.02                         | 0.03        | 52.2            |
| 6    | 0.06           | 0.03        | 1,000              | 0.02                         | 0.03        | 85.9            |
| 7    | 0.06           | 0.03        | 256                | 0.02                         | 0.03        | 96.4            |
| 8    | 0.06           | 0.03        | 64                 | 0.02                         | 0.03        | 100.0           |

**Table 3** - Standard competition assay:  $^{125}\text{I}$ -ALV-p15 vs Anti-p15 vs ALV-p15

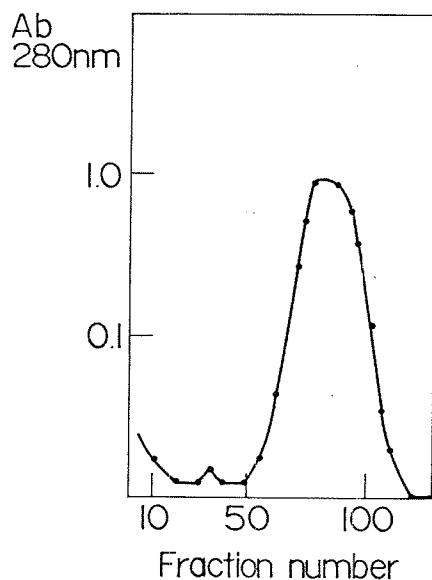
System: 0.03ml NRS dil 1:3; 0.02ml Anti-p15 dil 1:5,000; 0.02ml  $^{125}\text{I}$ -p15 (52,000cpm); p15 indicated concentration; 0.03ml SAR dil 1:256; TEN-2 to a volume of 0.250ml. The amount of precipitation in a tube without p15 was taken as 100%. For reaction details see "Radioimmunoassay" (Methods).

| Tube | Unlabelled p15<br>ng | Precipitation<br>(%) | Blockage<br>(%) |
|------|----------------------|----------------------|-----------------|
| 1    | -                    | 100.0                | 0.0             |
| 2    | 0.6                  | 84.71                | 15.29           |
| 3    | 1.2                  | 77.88                | 22.12           |
| 4    | 2.5                  | 41.39                | 58.61           |
| 5    | 5.0                  | 29.53                | 70.47           |
| 6    | 20.0                 | 22.67                | 77.33           |
| 7    | 40.0                 | 18.10                | 81.90           |

**Figure 1** - DEAE-cellulose chromatography of the fraction precipitated with ammonium sulphate. The rabbit serum was precipitated with cold saturated ammonium sulphate up to 50% saturation. After proper treatment, sample was applied on DEAE-cellulose column, eluted with 200mM phosphate buffer pH 8.0 and absorbance of the fractions measured at 280nm.

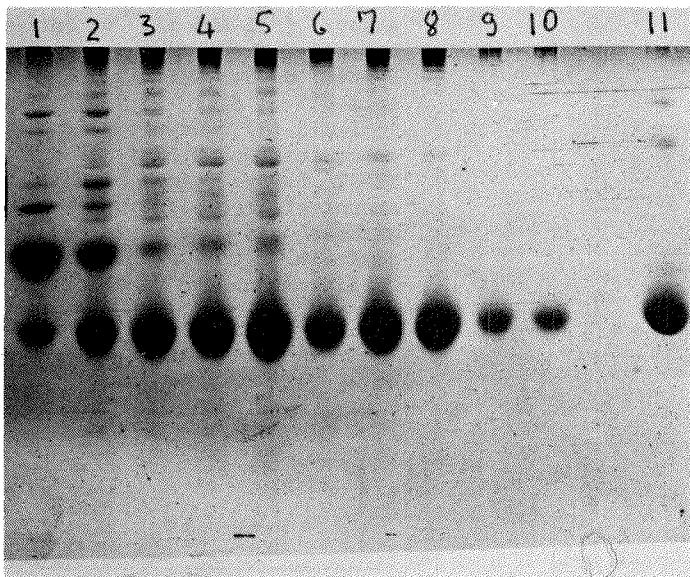


**Figure 2** - Sephadex G-200 filtration. The first peak from DEAE-cellulose column was concentrated, dialyzed and applied on Sephadex-G-200 column, eluted with 10mM PBS buffer pH 8.0 and the absorbance of fractions read at 280nm.



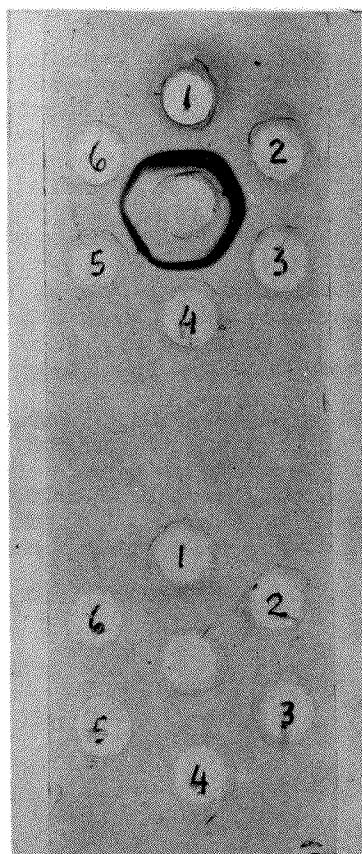
**Figure 3** - Polyacrylamide gel electrophoresis at 12.5% gel concentration.

Symbols: lanes 1.2 = whole serum; lane 3.4.5 = pellet resuspended (dialysed) from ammonium sulphate precipitation; lanes 6.7.8. = DEAE-cellulose column - first peak; lane 9 and 10 = Sephadex G-200 column - peak; lane 11 = standards.



**Figure 4 - Ouchterlony double diffusion gel.**

Symbols: Upper: central hole = purified rabbit IgG; side holes = sheep anti-rabbit IgG dil. 1:8; 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256. Lower: central hole = purified rabbit IgG. side holes = normal sheep serum dil 1:16; 1:32; 1:64; 1:128; 1:256 and diluting buffer.



#### References

1. Arend, W.P.; Hermodson, M.A. & Teller, D.C. - Characterization of two species of Fc fragments obtained from rat IgG 2a by prolonged papain digestion. *J. Immunol.*, 118:388-394, 1977.
2. August, J.T.; Bolognesi, D.P.; Fleissner, E.; Gilden, R.V. & Nowinski, R.C. - A proposed nomenclature for the virion proteins of oncogenic RNA viruses. *Virol.*, 60:595-601, 1974.
3. Bier, O.G.; Mota, I.; Silva, W.D. & Vaz, N.M. - Imunologia básica e aplicada 2ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1977.
4. Chen, J.H.; Hayward, W.S. & Hanafusa, H. - Avian tumour virus proteins and RNA in uninfected chicken embryo cells. *J. Virol.*, 14:1419-1429, 1974.
5. Davis, B.D.; Dulbecco, R.; Eisen, H.N.; Ginsberg, H.S. & Wood, W.B. - Microbiology, 3ed., New York, Harper International Edition, 1982.
6. Felipe, J.M.M.S. - Caracterização das proteínas estruturais dos retrovírus de aves: purificação, avaliação da reatividade imunológica e grau de expressão em células normais. São Paulo, Instituto de Química, USP, 1985 (Tese de Doutoramento).
7. Felipe, J.M.M.S. & Higuchi, T. - Characterization of endogenous avian tumour virus. *Arg. Biol. Tecnol.*, 27:104, 1984.

8. Higuchi, T. & August, J.T. - Characterization of tumour virus proteins. I. Radioimmunoassay of the p27 protein of avian viruses. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 10:1-14, 1977a.
9. Higuchi, T. & August, J.T. - Characterization of tumour virus proteins. II. Expression of the protein p30 in transformed productive and non-productive Ki/NRK cells. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 49:337-347, 1977b.
10. Jerne, U.K. - The somatic generation of immune recognition. *Europ. J. Immunol.*, 1:1-9, 1971.
11. Johnson, J.C.; Higuchi, T. & Geissner, R. - Immunological reactivity of simian sarcoma virus polypeptides isolated by preparative sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis. *Can. Jour. Microbiol.*, 27:238-242, 1981.
12. Kabat, E.A. & Tiselius, A. - An electrophoresis study of immune serum and purified antibody preparations. *J. Exp. Med.*, 69: 119-131, 1939.
13. Lowry, O.H.; Roserbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:255-275, 1951.
14. Nogueira, Z.M. & Higuchi, T. - Separação das cadeias "H" e "L" de imunoglobulina anti-P. *Ciênc. Cult.*, 36:694, 1984.
15. Ogata, H. & Higuchi, T. - Obtenção de anti-IgG de coelho - Determinação do sistema precipitante do radioimunoensaio. *Ciênc. Cult.*, 36:694, 1984.
16. Poljak, R.J. ; Amzel, L.M. & Phizackerley, R.P. - Studies on the three dimensional structure of immunoglobulins. *Proc. Biophys. Molec. Biol.*, 31:67-93, 1976.
17. Souza, J.M.M. & Higuchi, T. - Studies of the p15 structural proteins of avian mieloblastosis virus. *Arq. Biol. Tecnol.*, 26:M27-308, 1983.
18. Souza, J.M.M. & Higuchi, T. - Purification and properties of structural proteins of avian leukosis virus. *Arq. Biol. Tecnol.*, 26:M-28-300, 1983.
19. Weiss, S.R.; Teich, N.; Varmus, H. & Coffin, J. - RNA tumour virus: Molecular biology of tumour virus. 2ed., Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

## INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

### 5th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-5)

Será realizado no período de 27 de agosto a 1 de setembro, 1989 em Kyoto, Japão.

Todos os aspectos da pesquisa científica relacionados à ecologia de microrganismos serão discutidos. O programa incluirá conferências, simpósios, mesas-redondas e temas livres (orais ou "posters"). Os tópicos a serem discutidos serão os seguintes:

1. Processos microbianos nas comunidades marinhas.
2. Microbiologia de ambientes extremos.
3. Microbiologia de ambientes oligotróficos.
4. Microbiologia de sistemas gastrointestinais.
5. Microhabitats.
6. Análises da interação de sistemas microbianos.
7. Sucessões fúngicas.
8. Degradação da matéria orgânica no solo.
9. Fixação do nitrogênio na rizosfera.
10. Ecologia microbiana de campos submersos dos arrozais.
11. Micorrizas vesiculares-arbusculares.
12. Microbiologia de sedimentos.
13. Ecologia microbiana de sistemas de aquacultura.
14. Ecologia da "floração" de algas.
15. Distribuição de plasmídeos e vírus no ambiente aquático.
16. Microbiologia da poluição aquática e dos processos de tratamento de esgotos.
17. "Biofouling".
18. Adaptação genética aos xenobióticos.
19. Biodegradação de xenobióticos.
20. Microbiologia de alimentos fermentados.
21. Desenvolvimentos recentes na tecnologia microbiana de alimentos.
22. Transformações anaeróbicas.
23. Produção de toxinas em animais marinhos, por microrganismos.
24. Ecologia microbiana de interesse à microbiologia médica.
25. Problemática ambiental relacionada aos microrganismos produzidos por Engenharia Genética.
26. Nitrificação e denitrificação no ciclo do Nitrogênio.
27. Mensagens moleculares e intercomunicação nas comunidades microbianas.
28. Identificação de microrganismos a nível molecular.
29. Novos métodos em ecologia microbiana.

#### Contacto:

Prof. Usio Simidu  
 Secretary General  
 c/o Inter Group Corp.  
 Akasaka Yamakatsu Bldg, 8-5-32  
 Akasaka  
 Minato-ku, Tokyo 107, Japan  
 Telex: 02425181 IGC J

Divulgado por Profa. Dra. Maria Therezinha Martins, representante no Brasil na ICOME

End.: Av. Prof. Lineu Prestes ,1374  
 05508 São Paulo SP, Brasil

Nota: Pretendemos organizar um grupo para participação no evento.

Aos interessados: contactar Profa. Dra. Maria Therezinha Martins, Prof. Dr. Walderez Gambale ou Profa. Dra. Claudete Rodrigues Paula no endereço acima.

### **Valorização da revista científica nacional**

Estranha tendência tem sido observada de alguns tempos a esta parte entre os pesquisadores brasileiros, qual seja a de considerar trabalhos de valor somente aqueles publicados em revistas estrangeiras ou publicados em outra língua.

Não somos xenófobos ou contrários à publicação, em revista estrangeira, porém, é preciso considerar que a verdade não deixa de ser verdade seja ela publicada em revistas nacionais, seja em revistas estrangeiras, em português ou em outra língua. Parece que, por essa tendência, somente são publicados em revistas nacionais os falsos resultados, artigos incompletos ou de baixa qualidade.

Em determinadas áreas de pesquisa é fundamental e necessário que, o conhecimento adquirido com recursos pagos pelos contribuintes de impostos, seja levado aos profissionais, os professores, aos estudantes. É o que ocorre com os estudos realizados sobre doenças que ocorrem em nosso meio, como a paracoccidioidomicose, lobomicose, doença de Chagas, esquistossomose e outras, que não ocorrem nos países do primeiro mundo, onde são publicados.

Então qual interesse desses países em conhecer cada vez mais as doenças dos países menos desenvolvidos? Evidentemente, um dos aspectos mais importantes é a venda de tecnologia dos medicamentos, a tecnologia do diagnóstico, etc.

No campo do mercado editorial, é oportuno lembrar que os recursos enviados pelos autores, muitas vezes provenientes de agências governamentais, poderiam ser aplicados em revistas brasileiras, permitindo com isso melhorar a nossa indústria editorial e aprimorar a capacitação dos profissionais de empresa, nos seus vários setores.

As revistas brasileiras necessitam ser prestigiadas com artigos de boa qualidade, para permitir a penetração das mesmas em meios científicos internacionais.

O que é mais paradoxal em relação ao problema é a posição das agências de financiamento, as quais são avarrentas em relação às revistas brasileiras, porém, estimulam a publicação em revistas estrangeiras, fornecendo inclusive divisas em moedas estrangeiras que tanto fazem falta na importação de reativos e insumos que não fabricados no país.

Um dos argumentos utilizados é na escolha das revistas e o rigor aplicado na análise e seleção dos artigos feita por comissões editoriais, das revistas estrangeiras. Se as revistas brasileiras tivessem mais recursos, bom trabalho e fossem apoiados pelas comunidades científicas, poderiam melhorar seu padrão editorial e a qualidade dos artigos, ter periocidade rigorosa e divulgação mais ampla, além de poderem compor comissões editoriais mais rigorosas.

O desencolvimento científico e tecnológico do Brasil passa por um sistema aprimorado e avançado de comunicação e transferência dos novos conhecimentos, que devem atingir o interessado, com grande rapidez, precisão e clareza.

Paulo S. Minami

Departamento de Análises Clínicas e Tecnológicas  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP  
05508 São Paulo SP

### **II Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental**

A Sociedade Brasileira de Microbiologia e o Comitê Latino-Americano de Microbiologia Ambiental promoverão de 13 a 16 de outubro de 1988, no Hotel Majestic em Águas de Lindóia, SP, o II Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental. O evento tem por finalidade, não apenas a aquisição de conhecimentos e intercâmbio de informações, mas também um maior entrosamento do grupo.

O programa constará de conferências, cursos teórico-práticos demonstrativos e apresentação de trabalhos.

### VIII Simpósio Nacional de Fermentações

A Sociedade Brasileira de Microbiologia promoverá de 3 a 7 de agosto de 1988, o VIII Simpósio Nacional de Fermentações.

O local escolhido foi a estância climática de São Lourenço, MG., devido às facilidades de acesso, hospedagem e locomoção que a cidade proporciona aos participantes do evento, que estará sediado no Hotel Primus (tels. 035 - 331.1244 e 331.1835).

O VIII SINAFERM, como nos outros anos, constará de cursos pré-simpósio nos dias 3 e 4, e de conferências e apresentação de trabalhos originais de pesquisa nos dias 5, 6 e 7.

Afora os objetivos usuais de um evento deste tipo, pretendemos focalizar nas conferências o desenvolvimento mais recente nas várias áreas da Tecnologia de Fermentações e valorizar a apresentação dos trabalhos. Para tanto foi escolhido um Comitê Científico de renome nas diversas áreas mencionadas, que irá opinar sobre o programa do simpósio e avaliar os trabalhos enviados afim de selecioná-los, com o rigor necessário, para comunicação oral ou apresentação na forma de "poster" e publicação dos anais.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

### 6º Congresso Internacional de Coleções de Cultura

Tema: O "pool" genético microbiano

Organização: World Federation for Culture Collections

30 - Outubro até 5 de Novembro/88

University of Maryland

College Park, Maryland

Washington D.C. USA

O tema deste Congresso enfatiza a importância das coleções de cultura na preservação do "pool" genético e nas atividades de suporte aos programas de pesquisas científicos e tecnológicos.

O programa do Congresso consta de: Simpósios, discussões em mesas redondas e apresentação de "Posters".

**Simpósios :** "Microrganismos de ambientes extremos."

"Estabilidade das propriedades biológicas e químicas de microrganismos mantidos em coleções de cultura."

"Liberação de microrganismos produzidos por técnicas de Engenharia Genética, no meio ambiente".

Temas de algumas Mesas

Redondas: "Métodos de Isolamento"

"Padrões para coleções de culturas"

"Patentes, e condições de quarentena"

"Interface entre coleções de culturas e Ensino Superior"

"Cepas de Referência".

Taxa de Inscrição: US\$ 170,00 até 1 agosto/88.

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

8th International Biotechnology Symposium - 17 a 22 de Julho - 1988  
Paris - Palais des Congrès

Este Simpósio organizado pela Sociedade Francesa de Microbiologia pretende enfatizar o emprego da Microbiologia na vasta área da Biotecnologia. Baseando-se em aspectos fundamentais da ciência, engenharia e economia o programa abrange a maioria dos aspectos da biologia moderna. O programa científico inclui Temas-livres, posters e mesas redondas. Entre alguns tópicos a serem abordados incluem-se:

Microbiologia Básica, Genética de células animais, Genética de microrganismos, Cultura de células, Cinética de Bioprocessos, Controle e Tecnologia de Biorreator, Vacinas, Reagentes Biológicos, Recentes Progressos em Biotecnologia de Alimentos, novos desenvolvimentos na produção de produtos químicos industriais, Biohidrometalurgia, Tratamento de esgotos, Problemas Econômicos e Patentes, Segurança, Educação e Biotecnologia em países em desenvolvimento.

Taxa de Inscrição:

Participantes - 2500 Francos e Estudantes - 1000 Francos.

Endereço para correspondência:  
8th International Biotechnology Symposium  
c/o Société Française de Microbiologie  
25-28, Rue du Docteur Roux,  
75724 Paris CEDEX 15, France

I Simpósio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores.

A Sociedade Brasileira de Microbiologia, a Sociedade Brasileira de Virologia e a Fundação Instituto Oswaldo Cruz, promoverão sob a coordenação do Dr. Leon Rabinovich, o I Simpósio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores. O evento será realizado em novembro de 1988 no Rio de Janeiro.

Sociedade Brasileira de Microbiologia