

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 19 Número 2 Abr.-Jun. 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 deverão 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 nanô (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($m\mu$) micromicro ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; $10^{-6} m$), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; $10^{-9} m$), ao invés de milímicro ($m\mu$); e Angstroms (\AA ; $10^{-10} m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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



REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

Cid. Universitária - USP

05508-900 — São Paulo/SP

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

São Paulo — Brasil

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

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

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

Diretoria	Presidente Milton de Uzeda Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 21941 Rio de Janeiro RJ	Vice-Presidente Flavio Alterthum Instituto de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 05508 São Paulo SP
	Secretário Geral Leonardo Perego Jr. Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP Cidade Universitária 05508 São Paulo SP	Tesoureiro Walderez Gambale Instituto de Ciências Biomédicas USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 05508 São Paulo SP

Objetivos A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM. escrever para qualquer membro da Diretoria.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

Atlas Indústrias Químicas S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares
Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 19 ABRIL-JUNHO 1988 NÚMERO 2
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 18(2)

	CONTEÚDO	CONTENTS
Teixeira, L.M. Andrade, J.R.C. & Lourenço N.J.	93 Sorotipos e susceptibilidade antimicrobianos de amostras de <i>Streptococcus pneumoniae</i> isoladas no Rio de Janeiro, Brasil	Serotypes and antimicrobial susceptibility of <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolated in Rio de Janeiro, Brazil
Velazco, C. Teixeira, L.M. & Benchetrit, L.C.	100 Produção de β-lactamase por estafilococos coagulase-negativos e susceptibilidade antimicrobianos β-lactâmicos	Production of β-lactamase by coagulase-negative <i>Staphylococci</i> and susceptibility to β-lactam antimicrobial agents
Hofer, E. & Oliveira, L.M.A.	109 Sensibilidade antimicrobiana em amostras de <i>Listeria</i> isoladas de diferentes fontes e regiões do Brasil	Antimicrobial susceptibilities of <i>Listeria</i> strains isolated from different sources and areas in Brazil
Tortora J.C.de O. & Zbral, A.A.	113 Um surto de toxinfecção alimentar humana, no Rio de Janeiro, causado por chouriço contaminado com <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxigênico tipo A	A human food poisoning outbreak in Rio de Janeiro caused by sausage contaminated with enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> type A
Araújo, M.L.C.de Cardoso, M.S. Santiago, M.E.B. Andrioli, J.L. & Ito, I.I.	119 <i>Staphylococcus aureus</i> : Fagotipagem de amostras de portadores bovinos em lactação	<i>Staphylococcus aureus</i> : phage typing in samples of bovine carriers in lactation period
Watanabe, D.S.A. Decarlis, R.M.S.T. Michelin, L.A. & Montelli, A.C.	123 Fatores de virulência de amostras urinárias de <i>Escherichia coli</i>	Virulence factors of urinary <i>Escherichia coli</i> strains
Blanco, S.E. Kavka, J. Pappano, N.B. Debattista, N.B. Segovia, R.F. & Ferretti, F.H.	129 Actividad bacteriostática de 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona	Bacteriostatic activity of 2',4'-dihydroxy-3'-methoxychalcone
Lacerda, M.D. Pontes, J.D'.C. & Hofer, E.	135 Circulação de enterobactérias patogênicas em menores institucionalizados: II - Estudo bacteriológico	Circulation flow of enteropathogenic bacteria in institutional children: II - Bacteriologic study

Soares, L.A.	141	Resistência a amikacina e sisomicina em bacilos Gram-negativos e estafilococos	Resistance to amikacin and sisomicin in Gram-negative bacilli and staphylococci
Tortora, J.C.de O. & Oliveira, S.S.de	146	Uso da enterotoxina parcialmente purificada para a obtenção de antissoro visando o diagnóstico das toxinfecções alimentares por <i>Clostridium perfringens</i>	Use of partially purified enterotoxin to obtain antiserum for diagnosis of <i>Clostridium perfringens</i> food poisoning
Mathias, L.A. Pinto, A.A. Girio, R.J.S. & Perecin, D.	148	Uso da reação de fixação de complemento na diferenciação entre infecção experimental por <i>Brucella abortus</i> e por <i>Yersinia enterocolitica</i> sorogrupo 09 em bovinos	Use of complement fixation test in the differentiation of <i>Brucella abortus</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> serogroup 09 experimental infection in bovine
Filho, P.P.G.	155	Analise crítica da Portaria nº 67 (1985) do Ministério da Saúde que estabelece normas para registros de saneantes domissanitários, com ação antimicrobiana, no tocante aos produtos de uso hospitalar: Proposta alternativa	Critical approach of the Act 67 from the Brazilian Health Ministry which establish guidelines for the registration of hospital disinfectant and sanitizen products: alternative proposal
Linardi, V.R. Leão, S.F. Carvalho, C.T. & Cerqueira, D.A.	159	Estudo de fatores que inibem o crescimento de ferrobactérias em poços	Study of factors that inhibit the growth of iron bacteria in wells
Purchio, A. Gambale, W. & Paula, C.R.	166	Fungos filamentosos em águas litorâneas da Baixada Santista (Estado de São Paulo - Brasil)	Molds from some beaches in the southern area of São Paulo State (Baixada Santista), Brazil
Purchio, A. Gambale, W. Paula, C.R. Barbieri, W. Sabino, M. Meireles, M.C.A. & Iida, S.	172	Micotoxinas (aflatoxinas, patulina, ochratoxina A e sterigmatocistina) e correspondentes fungos micotoxigênicos em rações destinadas ao gado leiteiro	Survey of mycotoxins (aflatoxins, patulin, ochratoxin and sterigmatocystin) and correlate fungi in dairy cattle feedstuffs
Araújo, C.C.de Paula, M.de Q. Maia, R.F. & Lima, E.de O.	177	Avaliação da atividade antimicrobiana do composto 5,7,2',5'-tetraacetoxi-4-fenilcumarina obtido a partir de <i>Coutarea hexandra</i> (Rubiaceae)	Antimicrobial activity evaluation of 5,7,2',5'-tetraacetoxi-4-phenilcoumarin

Perez, J.N. Reis, L.F.L. Contijo, J.G. Queiroz, D.M.de M. Mendes, E.N. & Penna, F.J.	180	Participação de rotavírus e adenovírus na diarréia aguda da infância, em Belo Horizonte	Occurrence of rotavirus and adenovirus in children with acute diarrhoea in Belo Horizonte
Vicente, M. Fazio, G.De & Golher, R.R.	184	Efeito Inibidor do interferon de amnio humano (Hu Am IFN) sobre quatro vírus de plantas	Inhibitory effect of human amniotic interferon in four plant virus systems
Novo, M.A.da S. & Golher, R.R.	190	Produção de interferon por placenta humana	Production of interferon by the human placenta
Ribeiro, J.C.C. Guimarães, W.V. Borges, A.C. Silva, D.O. & Cruz, C.D.	196	Produção de levana e etanol por mutantes de Zymomonas mobilis CP4 durante a fermentação de sacarose	Levan and ethanol production by Zymomonas mobilis CP4 mutants during sucrose fermentation
Breda, M.* & Ioneda, T.	202	Produção de glicolipídios por Rhodococcus rhodochrous cultivado em galactose	Production of glycolipids by Rhodococcus rhodochrous grown on galactose
Takaki, M. Jordão, L.R. & Lopes, V.B.	207	Projeto de agitador de cultura líquida	Design of a liquid culture rotator
Informação Técnico-Científica SEM	210		

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

MCT  CNPq  finep

SEROTYPES AND ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE ISOLATED IN RIO DE JANEIRO, BRAZIL

Lúcia Martins Teixeira

Deptº de Microbiologia Médica
Instituto de Microbiologia UFRJ
Caixa Postal 68040
21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

João Ramos C. Andrade
& Nelson Jerônimo Lourenço

Serviço de Microbiologia e Imunologia
Faculdade de Ciências Médicas UERJ
20550 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

A total of 108 strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from patients with meningitis were studied. Serotyping was done by the capsular swelling (quellung) test. Twenty-nine different serotypes were identified. Serotypes 6B (13.8%), 1 (12.0%) and 3 (10.0%) were the most frequent, followed by serotypes 4, 14, 18C, 10A and 23F, representing 64.5% of the total number of isolates. Eighty-nine (82.2%) strains belonged to serotypes included in the 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine. The susceptibility of 59 strains to 16 antimicrobial agents was tested by a broth microdilution technique. Of all the isolates tested, 57 (97%) and 26 (44%) strains were resistant to, respectively, gentamicin and tetracycline. Only one strain was resistant to sulfamethoxazol-trimethoprim and all were susceptible to penicillin and chloramphenicol. Although penicillin resistance was not detected, 4 and 3 strains were only inhibited by concentrations as high as, respectively, 0.03 and 0.06 µg of penicillin/ml. Cefotaxine was the most active of the four cephalosporins tested.

Resumo

Serotipos e susceptibilidade a antimicrobianos de amostras de Streptococcus pneumoniae isoladas no Rio de Janeiro, Brasil

Foram estudadas 108 amostras de *Streptococcus pneumoniae* isoladas de pacientes com meningite. A sorotipagem foi realizada através de testes de entumescimento capsular, sendo identificados 29 diferentes sorotipos. Os sorotipos 6B (13,8%), 1 (12,0%) e 3 (10,0%) foram os mais frequentes, seguidos por 4, 14, 18C, 10A e 23F. Esses 8 sorotipos de maior prevalência constituiram 64,5% do total de amostras. Oitenta e nove (82,2%) amostras pertenciam a sorotipos incluídos na vacina pneumocócica composta por 23 agentes polissacarídicos tipo-específicos. A susceptibilidade de 59 amostras a 16 agentes antimicrobianos foi testada através da técnica de microdiluição em caldo. Das amostras testadas, 57 (97%) e 26 (44%) foram resistentes a, respectivamente, gentamicina e tetraciclina. Somente uma foi resistente ao sulfametoxazol-trimeteto-

prim e todas se apresentaram sensíveis a penicilina e ao cloranfenicol. Embora não tenham sido detectadas amostras consideradas resistentes a penicilina, 4 e 3 das amostras somente foram inibidas por concentrações respectivas de 0,03 e 0,06 µg de penicilina/ml. O cefotaxime se apresentou como a mais ativa das quatro cefalosporinas testadas.

Introduction

Streptococcus pneumoniae remains as a leading cause of pneumonia, meningitis and otitis media in humans (1, 18, 24). Although most of pneumococcal infections respond to treatment with penicillin, several reports have documented colonization and infections by penicillin-resistant pneumococcal strains (9, 10, 18, 20, 24). Therefore pneumococci are no longer believed to be highly uniformly susceptible to this antimicrobial.

Pneumococcal strains with decreased susceptibility to penicillins were first reported in Australia in 1967 (9) and have successively been isolated from clinical specimens from several parts of the world (8, 18, 21, 24). Meningitis caused by such strains may represent a serious clinical problem, since some patients have failed to respond to large doses of parenteral penicillin (21, 24). More recently, strains markedly resistant to penicillin have been recovered from patients and carriers and sporadic reports of isolation of penicillin-resistant pneumococci have continued from worldwide locations (10, 18, 24). Resistance to alternative drugs such as chloramphenicol, erythromycin and tetracycline has also been reported (18, 24).

The emergence of strains with multiple antibiotic resistance emphasized the need for a better understanding of the epidemiology of pneumococcal infections and for developing means of primary prevention. In an attempt to control pneumococcal infections polyvalent pneumococcal capsular polysaccharide vaccines have been introduced on the market and epidemiological studies have been stimulated in order to predict the validity of the application of the vaccine in a given population.

Considering the renewed interest in the recognition of pneumococcal types and the lack of data about their distribution and susceptibility in Brazil, the purpose of this study was to analyze the relationship between the serotypes isolated from patients with meningitis and those contained in the new 23-valent pneumococcal vaccine. The susceptibility of the isolates to penicillin and various other antimicrobial agents, including standard and some newer drugs, was also determined.

Materials and Methods

Bacterial isolates - A total of 108 strains of *S. pneumoniae* isolated from patients with meningitis in Rio de Janeiro, Brazil, between January 1981 and August 1982 were studied. Of these, 107 were isolated from cerebrospinal fluid and one from blood culture. Only one isolate from each patient was investigated. The patients were at different ages.

Identification - The identification of the isolates was based on colony morphology, Gram stain, optochin susceptibility and bile solubility tests and capsular swelling with specific antisera (6). The strains were typed by Neufeld capsular reaction tests with pneumococcal antisera prepared by the Biological Products Division, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga, USA. The Danish system of nomenclature was employed.

Antimicrobial susceptibility testing

Antimicrobial agents - The antimicrobial agents and their sources (in the USA) were as follows: cefamandole, cephalotin, erythromycin and vancomycin from Ely Lilly & Co., Indianapolis, Ind.; Cefoxitin from Merck, Sharp & Dohme Research Lab., Rahway, N.J.; cefotaxime from Hoechst-Roussel Pharmaceuticals Inc., Somerville, N.J.; chloramphenicol from Parke, Davis & Co., Detroit, Mich.; clindamycin from The

Upjohn Co., Kalamazoo, Mich.; gentamicin and rosaramicin from Schering Labs., Bloomfield, N.J.; penicillin G from Bristol Labs., Syracuse, N.Y.; nafcillin from Wyeth Labs. Inc., Philadelphia, Pa.; rifampin from Ciba-Geyg Corp., Summit, N.J.; streptomycin and tetracycline from Pfizer Inc., New York, N.Y.; sulfamethoxazole-trimethoprim from Burroughs-Wellcome Co., Research Triangle Park, N.C.

Inoculum preparation - The inocula were prepared from strains grown on neopeptone infusion agar supplemented with 5% defibrinated rabbit blood after overnight incubation at 35°C in a candle jar. Several colonies were removed from these plates, suspended in Mueller-Hinton broth (Difco) and adjusted to a turbidity equivalent to a 0.5 McFarland standard (approximately 10^8 cfu/ml). A further dilution of 1:10 was made in sterile distilled water.

MIC determinations - The MICs of 16 antimicrobial agents to 59 strains were determined by a broth microdilution technique adapted from Thornsberry and Swenson (23). Stock solutions of the antimicrobial agents were prepared with the appropriate diluents (19). Doubling dilutions of each antimicrobial were prepared in sterile distilled water to obtain solutions at 10 times each of the desired final concentrations. One part of the 10x solution was added to nine parts of Schaedler broth (BBL) supplemented with 5% lysed horse's blood to obtain each desired concentration. Volumes of 0.1 ml of the antimicrobial concentrations were dispensed into wells of microdilution plates with an MIC 2000 dispenser (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, Va., USA). Two control broth solutions containing no antimicrobics were included in each microdilution plate. After filling the plates were placed in plastic bags, sealed and stored at -70°C. Before inoculation the plates were removed from the freezer and allowed to warm to room temperature. Approximately 10^5 cfu/ml were dispensed into the antimicrobial microdilution plates using an automated inoculator (Dynatech). The plates were incubated in candle extinction jars at 35°C for 18 to 24 hours. MIC endpoints were defined as the lowest concentration of antimicrobial agent that resulted in inhibition of the growth as observed with the unaided eye.

Results

The serotype distribution among the 108 pneumococcal strains studied is shown in Table 1. A total of 29 different serotypes were identified but their prevalence varied. Serotypes 6B (13.8%), 1 (12.0%) and 3 (10.0%) were the most frequent, followed by serotypes 4, 14, 18C, 10A and 23F. Together, those 8 serotypes accounted for 64.5% of the strains. Among all the strains tested, 89 (82.2%) had polysaccharide type antigens identical to those included in the 23-valent pneumococcal vaccine. Only one isolate could not be typed. Although serotypes 1 and 3 were among the most common overall, they were not found among strains isolated from children younger than 1 year old. This age group comprised 35% of the total of patients.

The results of the susceptibility tests with 59 *S.pneumoniae* strains are presented in Table 2, which gives the 50% MIC values (MIC₅₀), 90% MIC values (MIC₉₀) and ranges for 16 antimicrobial agents. On the basis of recently published criteria (19) 57 (97%), 26 (44%) and 1 (1.7%) of the strains were resistant to, respectively, gentamicin, tetracycline and sulfametoazol-trimethoprim. Most of the strains were shown to be susceptible to penicillin in concentrations as low as 0.015 µg/ml or less. Although no penicillin-resistant isolates were found, four and three of the 59 strains tested were only inhibited by concentrations as high as, respectively, 0.03 and 0.06 µg of penicillin/ml. Those seven isolates showing diminished susceptibility to penicillin belonged to serotypes 9N, 10A, 12F, 14, 18C and 23F (2 strains). The most active of the cephalosporins tested was cefotaxime, which inhibited all the isolates at the concentration of 0.25 µg/ml. Cefamandole and cephalexin also showed good activity and cefoxitin was somewhat less effective.

Table 1 - Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients with meningitis in Rio de Janeiro, Brazil.

Symbols: ^aIn the Danish System; ^bSerotypes represented in the 23-valent pneumococcal vaccine; ^cIncludes one isolate each of types 7F, 8, 11A, 12F, 15B and 33F, ^dIncludes one isolate each of types 18A, 36, 45 and 48.

Serotype ^a	Nº (%) of isolates
Vaccine types^b	
1	13 (12.0)
2	2 (1.9)
3	11 (10.0)
4	7 (6.5)
5	2 (1.9)
6B	15 (13.8)
9N	4 (3.7)
10A	5 (4.6)
14	7 (6.5)
18C	7 (6.5)
19A	2 (1.9)
19F	3 (2.7)
23F	5 (4.6)
Other ^c	6 (5.6)
Subtotal	89 (82.2)
Nonvaccine types	
15C	2 (1.9)
16	2 (1.9)
24F	2 (1.9)
28F	2 (1.9)
34	4 (3.7)
40	2 (1.9)
Other ^d	4 (3.7)
Nontypable	1 (0.9)
Subtotal	19 (17.8)
TOTAL	108(100.0)

Discussion

The continuing significance of morbidity and mortality resulting from pneumococcal infections and the increasing resistance of pneumococci to antimicrobial agents stress the value of prophylactic approaches through the use of polyvalent pneumococcal vaccines. Therefore, the recognition of prevalent types of *S. pneumoniae* and their susceptibilities to antimicrobials in a given location is essential not only because of epidemiological reasons, but also in view of changing susceptibility patterns and searches for production of a successful vaccine.

The serotype distribution and susceptibility of *S. pneumoniae* strains have been extensively reported from the more developed countries but little information is available from the developing parts of the world. The purpose of this report was to present data obtained in the urban area of Rio de Janeiro, Brazil with documented cases of pneumococcal meningitis.

In this study, although 29 different serotypes were responsible for meningitis, 8 of them reached a cumulative frequency of 64.5%. Among all the isolates studied, serotype 6B occurred most frequently, followed by serotypes 1, 3, 4, 14, 18C, 10A and 23F. A previous report from another Brazilian area (São Paulo city) indicated a higher incidence of serotypes 6, 18, 1, 5, 23, 12, 2, 3, 4 and 8, in that order of frequency, accounting for around 63% of 175 cases of meningitis (22). Besides the

Table 2 - Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* strains^a isolated from patients with meningitis in Rio de Janeiro, Brazil.

Symbols: ^aA total of 59 isolates were tested; ^bConcentration at which at least 50% of the strains were inhibited; ^cConcentration at which at least 90% of the strains were inhibited.

Antimicrobial agent	MIC ($\mu\text{g/ml}$)		
	Range	MIC ₅₀ ^b	MIC ₉₀ ^c
Cefamandole	$\leq 0.008 - 0.5$	0.06	0.12
Cefoxitin	0.12 - 2	1	2
Cefotaxime	$\leq 0.008 - 0.25$	0.015	0.015
Cephalothin	0.015 - 0.5	0.12	0.25
Chloramphenicol	1 - 4	2	4
Clindamycin	$\leq 0.008 - 0.12$	0.06	0.06
Erythromycin	$\leq 0.008 - 0.25$	0.06	0.06
Gentamicin	2 - 64	16	32
Nafcillin	$\leq 0.008 - 0.25$	0.03	0.03
Penicillin	$\leq 0.004 - 0.06$	0.015	0.015
Rifampin	$\leq 0.008 - 0.12$	0.03	0.06
Rosaramicin	0.12 - 1	0.25	0.5
Streptomycin	8 - >32	32	>32
Sulfa-trimethoprim	4.8/0.25 - 76/4	9.5/0.5	19/1
Tetracycline	0.12 - 32	1	16
Vancomycin	0.12 - 0.5	0.25	0.5

possibility of geographic variations it has also been recognized that distribution of serotypes differs according to age group and site of infection and can also change over time (1, 7). On the other hand, considering the multiplicity of locations were studies on the distribution of pneumococcal serotypes were conducted it seems that there is some similarity among those most often responsible for disease, although differences on the prevalence can be observed. Thus, comparison of our findings with those reported from several other countries (1-3, 5, 7, 12-17, 25) revealed that serotypes 3, 4, 6 and 14 are, generally, among the most common serotypes isolated from clinically important specimens.

In spite of the fact that *S.pneumoniae* is one of the bacterial species more susceptible to antimicrobial agents, resistance to several drugs, including the ones of choice for treatment of pneumococcal diseases, specially penicillin, has been reported in recent years.

In this investigation, tetracycline - resistant pneumococci were found in a percentage (44%) higher than those reported in surveys performed in other countries (4, 17, 25) although close to percentages described by De Bac and colleagues (38.3%) in Italy (5) and lower than those found by Liñares and colleagues (72%) in Spain (14). The high incidence of tetracycline resistance among clinical isolates certainly precludes the use of this drug as an antipneumococcal agent.

Handwerger and Tomasz (8) recently summarized published surveys of pneumococcal penicillin susceptibility suggesting that the overall susceptibility to penicillin of clinical isolates of pneumococci has changed significantly since the start of the antibiotic era. The frequency of infections caused by penicillin-resistant pneumococci ($\text{MICs} > 1.0 \mu\text{g/ml}$) is not well defined and the isolation of such strains seems to be reported only occasionally. However, intermediately resistant isolates ($\text{MICs of } 0.1 - 1.0 \mu\text{g/ml}$), which have been associated with treatment failure (21, 24), particularly in meningitis, may be substantially more common (18, 21, 24). In addition, in several regions most clinical isolates now demonstrated MICs between 0.03 and 0.1 $\mu\text{g/ml}$ (8). In our survey, 7 strains had MICs of 0.03 or 0.06 $\mu\text{g/ml}$ which may represent a trend of increasing to penicillin in the Rio de Janeiro area. As several laboratorial studies indicated that penicillin resistance is a multigenic property that develops in a stepwise fashion (26), the appearance of such relatively insensitive pneumococci may be a harbinger of strains with clinically significant resistance.

Chloramphenicol is often used as an alternative drug in penicillin-allergic patients with serious pneumococcal infections or in patients with penicillin-resistant strains not responding to penicillin therapy. Nevertheless, as penicillin-resistant strains can also be resistant to chloramphenicol, it is now recommended that all clinically significant isolates must be submitted to susceptibility testing to penicillin and chloramphenicol (4, 11, 20).

The disk diffusion test using an oxacillin disk (1 μg) is the most convenient method to screen pneumococci for penicillin susceptibility, being more reliable than the use of a penicillin disk to discriminate between penicillin-susceptible and penicillin-resistant strains (20, 23).

On the basis of the information available in the literature some geographic variation in the prevalence of the pneumococci serotypes as well as in the patterns of antibiotic susceptibility has been noted in different locations. The newest polyvalent pneumococcal vaccine licensed for use in the United States, in 1983, is constituted by polysaccharides of the following 23 serotypes: 1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F. These serotypes represent 82.2% of the strains that we have identified. Thus, from the preliminary data obtained by us it seems that immunization of high-risk groups in the population of Rio de Janeiro would provide protection against around 82% of the pneumococci strains causing meningitis, which is probable a percentage that can be considered adequate to perform a good prophylactic campaign. However, since data on the prevalence of serological types and their susceptibilities should not be extrapolated to different regions in such a large country as Brazil, only the results of extensive and periodic surveys can help in the establishment of the more adequate treatment and prophylactic measures to be adopted.

Acknowledgments

This investigation was supported in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Part of this study was conducted while the senior author was a guest researcher at the Centers for Disease Control (CDC; Atlanta, Ga, USA) with fellowship support from the CNPq. We express our appreciation to Drs. R. Facklam and C. Thornsberry for providing the facilities of their respective laboratories at the CDC.

References

1. Austrian, R. - Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal diseases and its prevention. *Rev. Infect. Dis.*, 3:S1-S17, 1981.
2. Broome, C.V. & Facklam, R.R. - Epidemiology of clinically significant isolates of *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *Rev. Infect. Dis.*, 3:277-280, 1981.
3. Casal, J. - Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*: serotype distribution of penicillin-resistant strains in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22:222-225, 1982.
4. Cooksey, R.C.; Facklam, R.R. & Thornsberry, C. - Antimicrobial susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 13:645-648, 1978.
5. De Bac, C.; Andreoni, O.; Fara, G.M.; Giannanco, G.; La Placa, M. & Mascellino, M.T. - A multicentric study for serotyping and susceptibility to antibiotics of pneumococci in Italy. *La Ricerca Clin. Lab.*, 11:145-149, 1981.
6. Facklam, R.R. - Streptococci and Aerococci. In: Lennette, E.H.; Balows, A.; Hausler, W.J., Jr. & Truant, J.P. (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, DC, p.88-110, 1980.
7. Gray, B.M.; Converse, G.M. & Dillon, H.C.Jr. - Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing disease. *J. Infect. Dis.*, 140:979-983, 1979.
8. Handwerger, S. & Tomasz, A. - Alterations in penicillin-binding proteins of clinical and laboratory isolates of pathogenic *Streptococcus pneumoniae* with low levels of penicillin resistance. *J. Infect. Dis.*, 153:83-89, 1986.
9. Hansman, D. & Bullen, M.M. - A resistant pneumococcus. *Lancet*, 2:264-265, 1967.
10. Hansman, D.; Morris, S. & Gregory, M. - Pneumococcal carriage amongst Australian aborigines in Alice Springs, Northern Territory. *J. Hyg.*, 95:677-684, 1985.
11. Istre, G.R.; Humphreys, J.T.; Albrecht, K.D.; Thornsberry, C.; Swenson, J.M. & Hopkins, R.S. - Chloramphenicol and penicillin resistance in pneumococci isolated from blood and cerebrospinal fluid: a prevalence study in metropolitan Denver. *J. Clin. Microbiol.*, 17:472-475, 1983.
12. Kalin, M. & Lindberg, A.A. - Distribution of pneumococcal types in the Stockholm region 1976-1978. *Scand. J. Infect. Dis.*, 12:91-95, 1980.
13. Lauer, B.A. & Reller, L.B. - Serotypes and penicillin susceptibility of pneumococci isolated from blood. *J. Clin. Microbiol.*, 11:242-244, 1980.
14. Liñares, J.; Garau, J.; Dominguez, C. & Perez, J.L. - Antibiotic resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from patients with community-acquired pneumococcal disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23:545-547, 1983.
15. Lund, E.; Pulverer, G. & Jelyaszewicz, J. - Serological types of *Diplococcus pneumoniae* strains isolated in Germany. Comparison with patterns in other countries. *Med. Microbiol. Immunol.*, 159:171-178, 1974.
16. Michel, J.; Dickman, D.; Greenberg, Z. & Berger-Rabinowitz, S. - Serotype distribution of penicillin-resistant pneumococci and their susceptibilities to seven antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23:397-401, 1983.
17. Milatovic, D.; Machka, K.; Heck, W. & Bravery, I. - Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in West Germany. *Infection*, 9:220-222, 1981.
18. Mufson, M.A. - Pneumococcal infections. *J. Am. Med. Assoc.*, 17:1942-1948, 1981.
19. National Committee for Clinical Laboratory Standards - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that group aerobically; Approved

- Standard M7-A. NCCLS, Villanova, Pa, 1985.
- 20.Oxley, D.K. - Penicillin-resistant pneumococci. Arch. Pathol. Lab. Med., 108:106-107, 1984.
- 21.Paredes, A.; Taber, L.H.; Yow, M.D.; Clark, D. & Nathan, W. - Prolonged pneumococcal meningitis due to an organism with increased resistance to penicillin. Pediatrics, 58:378-381, 1976.
- 22.Pires, R.B.R.; Takeda, A.K.; Melles, C.E.A. & Taunay, A.E. - Detecção de antígenos polissacarídicos capsulares e tipagem de *Streptococcus pneumoniae* em líquido cefalorraquidiano pela contraimunoeletroforese. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 42:1-8, 1982.
- 23.Thornberry, C. & Swenson, J.M. - Antimicrobial susceptibility tests for *Streptococcus pneumoniae*. Lab. Med., 11:83-86, 1980.
- 24.Ward, J. - Antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*: clinical and epidemiologic aspects. Rev. Infect. Dis., 3:254-266, 1981.
- 25.Weber, F. & Kayser, F.H. - Antibiotic resistance and serotypes of *Streptococcus pneumoniae* in Switzerland. J. Infect., 1:53-59, 1979.
- 26.Zighehelboim, S. & Tomasz, A. - Multiple changes of penicillin-binding proteins in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother., 7:434-442, 1980.

PRODUCTION OF β -LACTAMASE BY COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCI AND SUSCEPTIBILITY TO β -LACTAM ANTIMICROBIAL AGENTS

Corsina Velazco

Lúcia Martins Teixeira

& Leslie C. Benchetrit

Deptº de Microbiologia Médica

Instituto de Microbiologia

Universidade Federal do Rio de Janeiro

21944 Rio de Janeiro RJ

Summary

Detection of β -lactamase by two different assays (acidimetric and chromogenic cephalosporin) was evaluated among 119 strains of coagulase-negative staphylococci (107 clinical and 12 hospital environment isolates) and compared with results of disk diffusion susceptibility testing. *S. saprophyticus* accounted for the majority of the isolates, with *S. epidermidis* and *S. cohnii* being the second and third most frequent species. Most of the strains (85%) were shown to be resistant to penicillin. Resistance to ampicillin was also frequently found (50.5%). Forty (33.5%) and 36 (30.5%) isolates were resistant to methicillin and oxacillin, respectively. Only two strains were resistant to cefalothin and all other β -lactams tested. Production of β -lactamase was detected in 29 (24.5%) strains by both methods tested. However, the chromogenic cephalosporin (nitrocefin) method yielded weak and delayed reactions with 13 (11%) additional strains, which had negative results by the acidimetric test and were resistant to penicillin. Although all β -lactamase positive strains were shown to be resistant to penicillin by disk diffusion tests no strong correlation was found between resistance to β -lactam antimicrobial agents and β -lactamase production.

Resumo

Produção de β -lactamase por estafilococos coagulase-negativos e suscetibilidade a antimicrobianos β -lactâmicos

A produção de β -lactamase foi pesquisada em 119 amostras de estafilococos coagulase-negativos (107 isoladas de material clínico e 12 de ambiente hospitalar). Para tal, foram empregados dois diferentes métodos: o acidométrico e o da cefalosporina cromogênica. Os resultados foram comparados com os de testes de susceptibilidade a antimicrobianos β -lactâmicos, executados pelo método de difusão em agar. Entre as amostras estudadas, *S. saprophyticus* foi a espécie de maior prevalência, seguida, respectivamente, por *S. epidermidis* e *S. cohnii*. A maioria das amostras (85%) se apresentou resistente a penicilina, sendo a resistência a ampicilina também de elevada frequência (50,5%). As resistências a meticilina e a oxacilina foram observadas, respectivamente, em 40 (33,5%) e 36 (30,5%) amostras. Somente 2 amostras foram resistentes a cefalotina, assim como aos outros β -lactâmicos testados. A produção de β -lactamase foi detectada em 29 (24,5%) amostras,

através dos dois métodos utilizados. Entretanto, pelo método da cefalosporina cromogênica (nitrocefén), foram obtidas reações fracas e tardias com 13 (11%) amostras adicionais, as quais forneceram resultados negativos pelo método acidométrico, mas se apresentaram resistentes a penicilina nos testes de difusão em agar. Embora todas as amostras produtoras de β -lactamase tenham se apresentado resistentes a penicilina nos testes de difusão em agar, não foi encontrada uma forte correlação entre resistência a agentes β -lactâmicos e a produção de β -lactamase.

Introduction

Progress made in the last few years on the taxonomy of staphylococci has led to the recognition of coagulase-negative staphylococci (CNS) as a heterogeneous group of microorganisms increasingly being implicated as important human pathogens (10,11,24). Despite of the fact that they have been frequently isolated from a wide variety of infections, including nosocomial ones (5,10) and are reported to be more resistant to antibiotics than their coagulase-positive counterparts (8,15,29), still relatively little comparative information on the antimicrobial susceptibility of these organisms is available, particularly considering each individual species.

A strong relationship between resistance to penicillin and β -lactamase production can be observed among *Staphylococcus aureus* strains, specially those isolated from nosocomial sources (19). However, among CNS this relationship is not so clear and the nature and clinical significance of β -lactamase produced by strains of CNS as well as the significance of the results of susceptibility tests suggesting resistance to penicillinase-sensitive penicillins (PSPs) when no β -lactamase can be detected deserve further evaluation (5,13,22).

Since β -lactamase production is considered to be the major mechanism of penicillin resistance among staphylococci methicillin and other penicillinase-resistant penicillins (PRPs) are important therapeutic agents for treatment of staphylococcal infections. Nevertheless, a significant percentage of CNS is resistant to methicillin (8,29,30) and an alternative antibiotic therapy must be chosen to treat infections caused by such strains. Furthermore, the management of antibiotic therapy for CNS infections is often complicated by the appearance of both high levels of resistance and/or high percentage of resistant (mostly multiple-resistant) strains in certain species (1, 2, 5, 15, 30), particularly in *S. epidermidis* and *S. haemolyticus*.

Although β -lactamase production and methicillin resistance have been extensively investigated in coagulase-positive staphylococci (*S. aureus*) there are relatively few reports on the study of such properties of coagulase-negative staphylococci. On the other hand, detection of β -lactamase as well as susceptibility to methicillin and oxacillin also deserve special attention as they are being considered as important markers for tracing the epidemiology of staphylococcal infections and can vary according to the geographic area and methodology used (1, 4, 13, 29).

Considering the aspects mentioned above and the lack of data related to strains isolated in Latin America, the purpose of the present study was to evaluate the performance of two different tests for detection of β -lactamase produced by CNS strains and to compare the production of this enzyme with the resistance to penicillin and other β -lactam antimicrobials among CNS isolated from clinical specimens and hospital environment sources in Lima, Peru.

Materials and Methods

Microorganisms - A total of 119 strains of coagulase-negative staphylococci isolated from a variety of clinical specimens (107 strains) as well as hospital environment sources (12 strains) were studied. The clinical specimens were from both inpatients and outpatients attended in hospital or private offices located in Lima, Peru. The isolates were classified into species according to the criteria of Schleifer and Kloos (24) and Kloos and Schleifer (11).

Antimicrobial susceptibility testing - Antimicrobial susceptibilities were determined by a standard agar diffusion technique (18) using commercial disks (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md, USA). The antibiotics used and their disk potencies were as follows: penicillin G (10U), ampicillin (10 μ g), methicillin (5 μ g), oxacillin (1 μ g) and cephalothin (30 μ g). The culture plates were incubated at 35°C for 24 h. To test susceptibility to methicillin, two sets of plates were used, one incubated at 35°C (as for the other antimicrobials) and the other at 30°C.

Tests for β -lactamase detection - The strains were tested for β -lactamase production by the acidimetric and the chromogenic cephalosporin methods. Before the tests were performed the production of β -lactamase was induced by placing a 5 μ g methicillin disk on the surface of each inoculated Mueller-Hinton agar plate. After a 18-24 h period of incubation at 35°C, growth from around the methicillin disk was tested for β -lactamase production. Acidimetric determinations were performed with reagents obtained from a commercial source (β -lactamase Detection Papers; Oxoid Ltd., Hampshire, England). Briefly, a loopful of organisms was streaked onto a β -lactamase test paper strip previously moistened with a drop of distilled water on a microscope slide. The test was considered as positive, indicating β -lactamase production, when the color of the streaked portion of the strip changed from violet to yellow within 1 h. The chromogenic cephalosporin tests were performed in wells of microdilution plates with 0.05 ml of cephalosporin substrate (Nitrocefén; Glaxo Group Research, Greenford, England) and a loopful of organisms, making a heavy suspension in the solution as previously described (27). Color change from yellow to red was taken to indicate production of β -lactamase. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *S. aureus* ATCC 29213 were used as negative and positive controls, respectively.

Results

Table 1 shows the sources of the 119 coagulase-negative staphylococci studied. Most of the isolates were recovered from urine (56 strains; 47%) and blood (47; 39.5%). Strains most frequently found in urine specimens were classified as *S. saprophyticus* while *S. epidermidis* was the predominant species isolated from blood.

By the disk susceptibility tests with five β -lactam antibiotics (Table 2), 101 strains (85%) were shown to be resistant to penicillin.

Resistance to ampicillin was also frequently found (60 strains; 50.5%). Forty (33.5%) and 36 (30.5%) strains were resistant to, respectively, methicillin and oxacillin. Only 2 isolates (1 *S. saprophyticus* and 1 *S. hominis*) were resistant to cephalothin: those strains were also resistant to the other β -lactams tested.

Table 2 also presents a comparison between the results obtained with two methods used for detection of β -lactamase production, according to the species of CNS

Table 1. Distribution of 119 coagulase-negative staphylococci strains according to the sources.

Symbols: ^a The numbers in parenthesis indicate percentages.

Species	Number of isolates from the following sources				
	Urine	Blood	Secretions	Environment	All sources
<i>S. saprophyticus</i>	31(82) ^a	7(18)	—	—	38(32)
<i>S. epidermidis</i>	4(15)	16(62)	3(11.5)	3(11.5)	26(22)
<i>S. cohnii</i>	9(56)	6(37.5)	—	1(6.5)	16(13.5)
<i>S. simulans</i>	2(17)	7(58)	—	3(25)	12(10)
<i>S. hominis</i>	—	4(30)	—	1(20)	5(4)
<i>S. warneri</i>	3(60)	2(40)	—	—	5(4)
<i>S. haemolyticus</i>	—	3(75)	1(25)	—	4(3.5)
<i>S. xylosus</i>	2(66.5)	—	—	1(33.5)	3(2.5)
Unidentified	5(50)	2(20)	—	3(30)	10(8.5)
Total	56(47)	47(39.5)	4(3.5)	12(10)	119(100)

Table 2. Susceptibility of 119 coagulase-negative staphylococci strains to β -lactam antimicrobials.

Symbols: ^aR, Resistant; ^bPE, Penicillin; Am, Ampicillin; Me, Methicillin; Ox, Oxacillin; Ce, Cephalothin; ^cWeak positive, Reactions characterized by a delayed and weak color change from yellow to orange

^dNumber of strains.

Species (Number of isolates)	Agar diffusion tests					β -lactamase tests				
	Number of R strains ^a					Chromogenic cephalosporin			Acidimetric	
	Pe ^b	Am	Me	Ox	Ce	Positive	Weak Positive ^c	Negative	Positive	Negative
<i>S. saprophyticus</i> (38)	32	9	16	13	1	18 ^d	7	30	1	37
<i>S. epidermidis</i> (26)	24	23	5	2		18		8	18	8
<i>S. cohnii</i> (16)	8		6	8			4	12		16
<i>S. simulans</i> (12)	12	10	2	7		2		10	2	10
<i>S. haemis</i> (5)	5	5	3	1	1	4		1	4	1
<i>S. warneri</i> (5)	5		2				1	4		5
<i>S. haemolyticus</i> (4)	4	3	1	1		3		1	3	1
<i>S. xylosus</i> (3)	3	3	1	1			1	2		3
Unidentified (10)	8	7	4	3		1		9	1	9
Total	(109)	101	60	40	36	2	29	13	29	90

tested. Clear positive reactions indicating β -lactamase production were detected in 29 (24.5%) strains by both methods. All those 29 strains were shown to be resistant to penicillin and ampicillin by the disk susceptibility testing; 7 were also resistant to methicillin and 1 to oxacillin. However, weaker and delayed reactions by the chromogenic cephalosporin test were found in 13 (11%) strains, including 7 *S. saprophyticus*, 4 *S. cohnii*, 1 *S. warneri* and 1 *S. xylosus*, which had negative results by the acidimetric test. All those 13 strains were resistant to penicillin; 3 were also resistant to oxacillin and 1 to ampicillin.

No correlation was found between methicillin susceptibility and β -lactamase production. Most of the 42 β -lactamase positive or weak positive strains (31 strains, 74%) were susceptible to methicillin and 29 (62.5%) of the 77 β -lactamase negative isolates were resistant. Methicillin resistant strains were found among β -lactamase producers and non producers. Eleven (26%) of the 42 β -lactamase positive isolates were resistant to methicillin and 29 (37.5%) of the 77 β -lactamase negative strains were resistant to methicillin. Twenty of the 77 strains that showed negative results for β -lactamase production by both methods were resistant to penicillin, ampicillin and/or methicillin and oxacillin. Among them 1 strain of *S. saprophyticus* was resistant to the five β -lactams tested.

Twelve different resistance patterns were found among all the strains studied (Table 3). *S. epidermidis* was the single species most frequently associated with β -lactamase production and resistance to both penicillin and ampicillin, which was the predominant resistance pattern.

Discussion

Recognition of the pathogenicity of CNS, and the increasing significance of some species as important pathogens, have stressed the need for fuller species identification of those microorganisms. Our findings of *S. saprophyticus* and *S. epidermidis* as predominant species isolated from urine and blood are consistent with those generally found in the literature (2, 5, 20, 21, 29). *S. epidermidis* and *S. saprophyticus* are well documented as opportunistic pathogens. Strains of *S. saprophyticus* are referred as having a propensity to infect the urinary tract and as a common cause of acute urinary infections in young women (2, 13, 15, 20). *S. epidermidis* is frequently isolated from blood and cerebrospinal fluid probably because of its special ability to infect indwelling artificial devices and to cause bacteremia in compromised patients (1, 5, 26, 29). It is interesting to note, however, that there are reports of surveillances where only few (5) or no (26, 30)

Table 3. Patterns of resistance to β -lactams and β -lactamase production among TT9 coagulase-negative staphylococci strains.

Symbols: a+, strains positive for β -lactamase production by both chromogenic cephalosporin and acidimetric tests; b+w, strains weakly and delayed positive for β -lactamase production when tested by the chromogenic cephalosporin test and negative by the acidimetric test; c-, strains negative for β -lactamase production by both chromogenic cephalosporin and acidimetric tests e^d see Table 2, footnote b, for antimicrobial abbreviations.

Antimicrobial resistance patterns	Species (Number of β -lactamase positive, weakly positive or negative strains)										Unidentified	Total								
	<i>S. saprophyticus</i>		<i>S. epidermidis</i>		<i>S. cohnii</i>		<i>S. simulans</i>		<i>S. hominis</i>		<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. xylosus</i>							
	+a	+w	-c	+	-	+	+w	-	+	-	+w	-	+w	-						
Pe+d	6	7	1			1	2				1	2		1	21					
Me	1			1										2	9					
Cx	3						3								6					
Pe Am			12	5		1	3	1	1						32					
Pe Me		4									2	3		1	4					
Pe Ox	1	5			2	2		2							6					
Me Cx	2														12					
Pe An Me	1	6	4					1	2						2					
Pe An Ox		1	1				4								14					
Pe Me Cx				1											1					
Pe An Me Ox	1				1							1			2					
Pe An Me Cx Oe	1					1							1	1	5					
Susceptible															2					
															1					
Total	1	7	30	18	8	4	12	2	10	4	1	1	4	3	1	1	2	1	9	119
			38		26	16		12		5		5	4		3		10			

S. saprophyticus strains were isolated.

The clinical interest in CNS is also directed to the study of their susceptibility to antimicrobials, specially the β -lactams which are the most useful agents for the treatment of infections caused by staphylococci. The disk diffusion method is probably the most frequently used for testing susceptibility of those microorganisms, and is often complemented with some type of β -lactamase test in order to determine the need for a penicillinase-resistant penicillin in the treatment of infections caused by them.

By using the disk diffusion method we found that resistance to penicillin was not necessarily associated with ampicillin resistance. On the basis of the existing standard recommendations (18), discrepancies between the susceptibility of staphylococci to penicillin and other PRPs, such as ampicillin, are not supposed to occur. However, our findings as well as results of others (2, 9, 12, 15) also showing this kind of discrepancy at variable degrees, warrant the need for a revision on this matter. The percentage (33.5%) of methicillin resistance among our isolates was similar to that described by Sabath et al. (23) among *S. epidermidis*. A similar but not equal percentage (30.5%) of strains resistant to oxacillin was observed. According to the current reference procedures (18) either oxacillin, methicillin or nafcillin may be tested and results can be applied to the other two. However, this is also a controversial subject since reports of some degree of variability on the results for this 3 drugs are available in the literature (6, 14, 16, 28). Disk diffusion and dilution methods have been compared, and no one method has been reported to be consistently reliable to detect resistance to PRPs among staphylococci (6, 14). According to Lowy et al. (14) the disk diffusion tests predicted resistance to PRPs among CNS strains more reliably than the broth dilution methods, although there was a significant difference in sensitivity between the nafcillin and oxacillin disks. A question may be raised on the possibility of the heterogeneity of the resistance trait expression, known to be a salient feature on PRPs - resistant staphylococci, could vary according to not only the populations of strains studied and the methodological procedures employed but also depending on the PRP used to reveal it.

Most of the CNS strains studied by us were susceptible to cephalothin (only 2 were resistant) as it has also been reported by others (2, 8, 15). Susceptibility to cephalosporins is another controversial aspect on the analysis of susceptibility of CNS to β -lactam antibiotics. It is generally accepted that when a strain of *Staphylococcus* is found to be resistant to methicillin or any other PRP, it should also be assumed to be resistant to cephalosporins, regardless of in vitro test

results (16, 18). The issue is much less clear with CNS resistant to PRPs but the tendency is to take the most conservative approach and not use cephalosporins or other β -lactam agent to treat infections caused by them. Studies are needed to ascertain whether PRPs - resistant CNS isolates that are susceptible to cephalosporins by in vitro tests are also clinically susceptible to cephalosporins.

Although all the β -lactamase strongly positive strains in this study were resistant to penicillin and ampicillin the reverse was not true and, considering the total number of strains, no strong correlation was found between the resistance to penicillin and/or ampicillin as demonstrated by the results of disk susceptibility tests and β -lactamase production. It should be pointed out, for example, that many of *S. saprophyticus* and *S. cohnii* penicillin resistant strains did not produce β -lactamase and were susceptible to ampicillin, suggesting not only a resistance mechanism apart from β -lactamase production, but also different resistance mechanism between the two antimicrobials or differences on the expression of the same mechanism (s). Interestingly, in *S. epidermidis* and two species represented by few numbers, *S. haemolyticus* and *S. hominis*, the resistance to penicillin correlated well with ampicillin resistance and β -lactamase production. Only clear-cut positive or negative results were obtained when testing strains of these species by either of the β -lactamase tests used. Both methods used for β -lactamase detection, acidimetric and chromogenic cephalosporin, were in agreement for 89.8% of the total strains. The acidimetric assay gave clear-cut positive or negative results. However, thirteen strains that were negative by this method gave what we called weak and delayed positive reactions when tested by the chromogenic cephalosporin method. These reactions were characterized by a delayed (in general, more than ten minutes after addition of the reactants) and weak color change from yellow to orange. The typical red color that characterizes the positive reactions by this method was not reached by these 13 strains after 1 hour reading as it is generally recommended for staphylococci (27) or even after 4 hours as recommended by others (13). Color development by the positive strains that also gave positive results by the acidimetric assay was rapid (less than 10 min) and easy to interpret.

If the reactions considered by us as weak positive were not considered as positive at all, then the results of both methods would be in full agreement. Additional tests must be performed to confirm the presence of β -lactamase in those weakly positive strains but, with data available now, we consider them positive since they were all resistant to penicillin, suggesting that the chromogenic cephalosporin assay may be more reliable than the acidimetric assay for detection of β -lactamases produced by CNS.

Our finding that *S. epidermidis* was the CNS most frequently associated to β -lactamase production is in accordance with previous reports (3,4,25). We found that 62% of all β -lactamase producing isolates belonged to this species. As we emphasized before, although we studied only 5 strains of *S. hominis* and 4 of *S. haemolyticus*, 4 strains of the former species and 3 of the latter were also positive by both β -lactamase detection tests. As with *S. epidermidis* these two species have been recognized as having clinical significance (10). On the other hand, among the *S. saprophyticus*, which was the predominant species (38 strains), only 1 was positive for β -lactamase by both tests and 7 others were weak positive by the chromogenic cephalosporin assay. Those results are in contrast with those reported by Latham et al. (13) who found 55 β -lactamase positive strains among a total of 67 *S. saprophyticus*. Richardson & Marples (22) also detected β -lactamase production in 64 and 61 of 80 strains of *S. saprophyticus* by, respectively, the chromogenic cephalosporin and a direct microbiological method, although they could not detect any activity of this enzyme by the iodometric method. All the 49 strains of *S. saprophyticus* studied by Fass et al. (3) gave negative results when tested by the acidimetric method and 30 (61%) were weakly positive in the nitrocefin tests. If differences on β -lactamase testing in CNS are due to technical problems, related to the possible production of a form of the enzyme not easily detectable by some of the methods used, or a function of the strains tested is another point to be elucidated. On the other hand, if results such ours indicate that disk diffusion tests are not good predictors of the production of β -lactamase by CNS, attempts to

correlate this trait with results of dilution tests have also failed. Isolates with low minimal inhibitory concentration (< 0.05 µg/ml) for penicillin but a well defined inhibition zone edge around penicillin and/or ampicillin disks are reported to correspond to β -lactamase producers (4, 25). In this case, disk diffusion tests are claimed to give a better indication of β -lactamase production and it is recommended that even CNS isolates with MIC's < 0.05 µg/ml tested only by MIC must be tested for β -lactamase production (4,25).

The fact that no correlation was found between β -lactamase production and susceptibility to methicillin was not surprising since methicillin resistance is generally chromosomally mediated and related to alterations of penicillin-binding proteins (7). However, a resistance mechanism different from that of intrinsic resistance (heteroresistance) has been demonstrated in some *S. aureus* strains that are resistant to PRPs because they are able to partially inactivate these agents with their β -lactamases, when present in sufficient quantities for a sufficient duration (17).

In conclusion, our findings as well as others reported in the literature document discrepant results and interpretation problems in susceptibility tests with CNS suggesting that the criteria presently used to define susceptibility or resistance of those organisms to some antimicrobial agents, specially β -lactamas, may not be appropriate to all CNS species. This is understandable since CNS constitute a heterogeneous group of microorganisms and the current interpretation of susceptibility tests is based on criteria developed mostly for *S. aureus*.

Until further extensive studies are undertaken, correlating results of dilution and disk diffusion tests and clinical trials, permitting the assessment of the interpretive guidelines for CNS species, it is reasonable to recommend that, when testing those microorganisms to β -lactam susceptibility by disk diffusion tests, a penicillin G disk must be used instead of ampicillin to predict resistance to PSPs. A β -lactamase test might be helpful and the chromogenic cephalosporin must be preferred. However, a negative result does not discard the possibility of resistance to PSPs. Both methicillin and oxacillin disks should be tested to predict resistance to PRPs. As a matter of caution and on the light of the current recommendations it is advisable to take the most conservative approach and report CNS strains that are shown to be resistant to either one of the PRPs tested as resistant to the other β -lactams and, therefore, the use of those antimicrobial agents should not be recommended to treat infections caused by them.

Acknowledgments

This study was supported by grants from FINEP, CNPq, CAPES and CEPG (Federal University of Rio de Janeiro).

We thank Dr. Milton de Uzeda for the generous supply of the chromogenic cephalosporin and Profs. William Flores and Sonia Burstein for providing some of the isolates. We also express our appreciation to Drs. C. Thornsberry and P. B. Smith for their valuable comments on the manuscript. C.V. was supported by Universidad Nacional de San Marcos, Lima, Peru and a fellowship from the Organization of American States.

References

1. Archer, G.L. & Tenenbaum, M.J. - Antibiotic resistant *Staphylococcus epidermidis* in patients undergoing cardiac surgery. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17:269-272, 1980.
2. Bourgault, A.M. & Gauvreau, L. - Antimicrobial susceptibilities of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23:793-795, 1983.
3. Fass, R.J.; Helsel, V.L.; Barnishan, J. & Ayers, L.W. - In vitro susceptibilities of four species of coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 30:545-552, 1986.

4. Gill, V.J.; Manning, C.B. & Ingalls, C.M. - Correlation of penicillin minimum inhibitory concentrations and penicillin zone edge appearance with staphylococcal beta-lactamase production. *J. Clin. Microbiol.*, 14:437-440, 1981.
5. Gill, V.J.; Selepak S. & Williams, E.C. - Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 18:1314-1319, 1983.
6. Hansen, S.L. & Freedy, P.K. - Variation in the abilities of automated, commercial, and reference methods to detect methicillin-resistant (heteroresistant) *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 20:494-499, 1984.
7. Hartman, B.J. & Tomasz, A. - Low-affinity penicillin-binding protein associated with β -lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 158:513-516, 1984.
8. John, J.F., Jr. & McNeill, W.F. - Activity of cephalosporins against methicillin-resistant, coagulase-negative staphylococci: minimal effect of beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 17:179-183, 1980.
9. Kirchhoff, L.V. & Sheagren, J.N. - Epidemiology and clinical significance of blood cultures positive for coagulase-negative *Staphylococcus*. *Infect. Control* 6:479-486, 1985.
10. Kloos, W.E. - Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Newsletter*, 4:75-79, 1982.
11. Kloos, W.E. & Schleifer, K.H. - Isolation and characterization of staphylococci from skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25:62-79, 1975.
12. Larson, E.L.; McGinley, K.J.; Foglia, A.R.; Talbot, G.H. & Leyden, J.J. - Composition and antimicrobial resistance of skin flora in hospitalized and healthy adults. *J. Clin. Microbiol.* 23:604-608, 1986.
13. Latham, R.H.; Zelesnik, D.; Minshew, B.H.; Schoenknecht, F.D.; & Stamm, W.E. - *Staphylococcus saprophyticus* β -lactamase production and disk diffusion susceptibility testing for three β -lactam antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 26:670-672, 1984.
14. Lowy, F.D.; Chang, D.S.; Aning, V.; Williams, S. & Szilagyi, G. - Reliability of in vitro susceptibility tests for detecting coagulase-negative staphylococcal resistance to penicillinase-resistant semisynthetic penicillins. *J. Clin. Microbiol.* 18:1122-1126, 1983.
15. Marsik, F.J. & Brake, S. - Species identification and susceptibility to 17 antibiotics of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 15:640-645, 1982.
16. McDougal, L.K. & Thornsberry, C. - New recommendations for disk diffusion antimicrobial susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 19:482-488, 1984.
17. McDougal, L.K. & Thornsberry, C. - The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase-resistant penicillins and cephalosporins. *J. Clin. Microbiol.* 23:832-839, 1986.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. - Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, 3rd ed. Approved standard:M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1984.
19. Neu, H.C. - Antibiotic inactivating enzymes and bacterial resistance. In: Lorian, V. (ed). *Antibiotics in laboratory medicine*. The Williams & Wilkins Co. Baltimore p. 757-789, 1986.
20. Nicolle, L.E.; Hoban, S.A. & Harding, G.K. - Characterization of coagulase-negative staphylococci from urinary tract specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 17:267-271, 1983.
21. Price, S.B. & Flournoy, J. - Comparison of antimicrobial susceptibility patterns among coagulase-negative staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 21:436-440, 1982.
22. Richardson, J.F. & Marples, R.R. - Differences in antibiotic susceptibility between *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 6:499-510, 1980.
23. Sabath, L.D.; Barret, F.F.; Wilcox, C.; Gerstein, D.A. & Finland, M. -

- Methicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 72:302-306, 1968.
24. Schleifer, K.H. & Kloos, W.E. - Isolation and characterization of staphylococci from human skin. I. Amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25:50-61, 1975.
25. Selepak, S.T. & Witebsky, F.G. - β -lactamase detection in nine staphylococcal species. *J. Clin. Microbiol.*, 20:1200-1201, 1984.
26. Sewell, C.M.; Clarridge, J.E.; Young, E.J. & Guthrie, R.K. - Clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 16:236-239, 1982.
27. Thornsberry, C.; Gavan, T.L. & Gerlach, E.H. - New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Cumitech 6. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1977.
28. Thornsberry, C. & McDougal, L.K. - Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 18:1084-1091, 1983.
29. Varaldo, P.E.; Cipriani, P.; Foca, A.; Geraci, C.; Giordano, A.; Madeddu, M.A.; Orsi, A.; Pompei, R.; Prenna, M.; Repetto, A.; Ripa, S.; Rosselli, P.; Russo, G.; Scazzocchio, F. & Stassi, G. - Identification, clinical distribution, and susceptibility to methicillin and 18 additional antibiotics of clinical *Staphylococcus* isolates: nationwide investigation in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, 19:838-843, 1984.
30. Wilkinson, B.J.; Maxwell, S. & Schaus, S.M. - Classification and characteristics of coagulase-negative, methicillin-resistant staphylococci. *J. Clin. Microbiol.*, 12:161-166, 1980.

SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA EM AMOSTRAS DE LISTERIA ISOLADAS DE DIFERENTES FONTES E REGIÕES DO BRASIL

Ernesto Hofer
 & Laura Maria Abreu Oliveira

Depto de Bacteriologia
 Instituto Oswaldo Cruz FIOCRUZ
 Caixa Postal 926
 21041 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Em 298 amostras de *Listeria*, isoladas no período de 1966 - 1986 provenientes de diferentes fontes (humana, animal e vegetal) e de algumas regiões do país, determinou-se o nível de suscetibilidade frente a 14 antimicrobianos, através da técnica de difusão em agar, com discos impregnados. O padrão de sensibilidade obtido, revelou uma extrema homogeneidade, não possibilitando distinções em alguns dos parâmetros confrontados (fonte e período de isolamento, origem geográfica e sorotipo).

Uma acentuada sensibilidade ($\geq 90\%$ das amostras) foi observada em relação à gentamicina, sisomicina, cefalotina, ampicilina, sulfametoazol-trimetropirim e tetraciclina.

Summary

Antimicrobial susceptibilities of Listeria strains isolated from different sources and areas in Brazil

298 strains of *Listeria* isolated from 1966 to 1986, coming from different sources (human, animal and vegetal), collected in distinct areas in Brazil, had there level of susceptibility determined using 14 antimicrobial agents, by agar disk diffusion test.

The pattern of sensibility obtained shows an extreme homogeneity, do not allowing to observe a clear distinction for some parameters challenged (source and time period of isolation, geographic areas and serovar-serotype).

An increased sensibility ($\geq 90\%$ of the strains) was demonstrated in relation to the gentamicin, sisomicin, cephalothin, ampicillin, sulfamethoxazol-trimethoprim and tetracycline.

Introdução

As espécies atualmente pertencentes ao gênero *Listeria* (11,12) distribuem-se de forma ubíqua em natureza, determinando algumas em certas situações, como a *Listeria monocytogenes*, graves infecções no homem e animais. Na ocorrência deste acontecimento, a medida terapêutica mais indicada, reside no emprego de antimicrobianos. Neste caso, as citações mais comumente referidas, tanto do ponto de vista laboratorial como clínico, se concentram na penicilina e seus derivados semi-sintéticos, aminoglicosídeos e certas associações sinérgicas, envolvendo particularmente, a ampicilina e gentamicina (2,9,10).

O presente estudo objetivou ofertar subsídios sobre a suscetibilidade "in vitro"

aos agentes antimicrobianos de amostras de *Listeria*, previamente isoladas e identificadas em nosso meio (4,5,6,7).

Material e Métodos

1- Amostras bacterianas - Foram selecionadas 298 amostras, oriundas de várias fontes e regiões do país, colecionadas durante o período de 1966 a 1986 (Tabela 1). A identificação bioquímica das amostras foi realizada de acordo com o procedimento referido por Seeliger & Welshimer (13), não sendo, por conseguinte, submetidas aos testes atualmente recomendados por Rocourt & col. (11,12), para a especiação das listerias. Por tal razão as culturas em estudo, foram reconhecidas somente até o gênero. Na caracterização sorológica, adotou-se as orientações preconizadas por Donker-Voet (3) e Seeliger & Höhne (14), relacionando-se a distribuição dos sorotipos identificados e analisados, segundo as suas fontes de isolamento na Tabela 2.

2- Teste de suscetibilidade - Foi realizado através da técnica de difusão em agar (Muller-Hinton Agar, Difco) seguindo as recomendações de Bauer & col. (1). Os discos impregnados de antimicrobianos (CECON), sofreram regularmente as observações de controle de qualidade, empregando-se as amostras padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Resultados e Discussão

O grau de suscetibilidade revelado pelas 298 amostras de *Listeria* frente aos 14 antimicrobianos utilizados, pode ser analisado na Tabela 3.

Em princípio, assinala-se que teoricamente existia a expectativa de reconhecer níveis de suscetibilidade dos mais diversificados na amostragem analisada. Tal hipótese respaldava-se em dois pontos: 1- o numeroso contingente de culturas examinadas 2- admitia-se que, a arraigada utilização de antibióticos e quimioterápicos nas várias áreas (médica, veterinária, agricultura e alimentos) em nosso meio, também tivesse exercido alguma influência sobre as listerias. Todavia, os resultados demonstraram uma notável predominância do perfil de sensibilidade, sublinhando-se apenas como particularidade, a discrepância do comportamento das amostras humanas e animais, diante da kanamicina e rifampicina (Tabela 3). No cômputo geral, no entanto, tais diferenças se diluem na homogeneidade dos resultados, não implicando em alterações de vulto, naqueles

Tabela 1 - Distribuição numérica das amostras de *Listeria* analisadas segundo as fontes de isolamento e áreas geográficas.

Símbolos: * Animal - Bovinos normais, portadores, ** Vegetal - Folhas de alface.

Regiões	Origem			Total
	Humana	Animal*	Vegetal**	
Pernambuco	4	-	-	4
Bahia	2	-	-	2
Rio de Janeiro	30	202	10	242
São Paulo	45	-	-	45
Paraná	2	-	-	2
R. G. Sul	3	-	-	3
Total	86	202	10	298

Tabela 2 - Distribuição numérica dos sorotipos de *Listeria* identificados de acordo com a fonte de isolamento.

Símbolos: * LCR (Líquido cefalorraquidiano); Hemoc. (Hemocultura) e Plac. (Placenta); ** ND - Não determinado.

Sorotipos	Humana			Animal	Vegetal	Total	
	LCR	Fezes	Hemoc.				
L 1/2 a	18	10	3	1	11	-	43
L 1/2 b					8		8
L 1/2 c		1			2		3
L 4a	3	1			82		86
L 4b	37	1	3	3	26		70
L 4ab	2			1	7		10
L 4c					1		1
L 4f					39	10	49
L 4g				1			1
ND**		1			26		27
Total	60	14	6	6	202	10	298

parâmetros passíveis de confrontação (fonte de isolamento, origem geográfica, ano de isolamento ou sorotipo). Assim, os resultados ora obtidos, se coadunam de forma quase integral àqueles relatados na literatura (2,9,10).

Assinala-se no caso dos fármacos eletivos no tratamento da listeriose humana (ampicilina e gentamicina), índices de sensibilidade bem elevados, embora seja prematuro afiançar a imutabilidade desse fenômeno, tendo em vista a detecção de amostras resistentes à ampicilina em todas as fontes de isolamento (Tabela 3).

Com base ainda nos dados figurados na Tabela 3, destaca-se o comportamento dispar das cefalosporinas, tendo de um lado a cefalotina, demonstrando uma magnífica atividade, consignada por mais de 90% de amostras sensíveis. Em contraposição, nas gerações mais recentes desses antibióticos, como a cefoxitina, obteve-se o mais elevado índice de resistência, envolvendo amostras de todas as origens. Curiosamente, apesar da excelente atuação "in vitro" da cefalotina sobre membros do gênero *Listeria*, tal propriedade não deve ser extrapolada para a condição "in vivo", pois ocorre uma extraordinária queda do poder bactericida do antibiótico (8).

Como outro aspecto correlacionado à expectativa da resposta terapêutica dos antimicrobianos na listeriose, assinala-se que 30 a 50% dos indivíduos doentes, sucumbem à infecção, mesmo na vigência do tratamento com antibióticos, previamente selecionados através de antibiograma (15). Dentre os principais fatores envolvidos no problema, suscitam-se os seguintes:

a- A bactéria incide mais freqüentemente sobre hospedeiros imunodeficientes (recém-nascidos, idosos e portadores de doenças crônico-degenerativas).

b- A *Listeria* sobrevive e se multiplica no interior de células do sistema retículo-endotelial, ponto inacessível para a ação dos antimicrobianos sobre o agente.

c- As incorreções do diagnóstico laboratorial, que com freqüência caracterizam à *Listeria* como "difteróide", rotulado como mero contaminante e, que implica na interrupção do exame bacteriológico.

Agradecimentos

Aos técnicos de pesquisa, Rosemary Ribeiro e Deise Paranhos, pela valiosa colaboração técnica.

Referências Bibliográficas

- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
- Boisivon, A. - Action bactériostatique et bactéricide comparée des pénicillines, céphalosporines, aminosides et des associations ampicilline-gentamicine et triméthoprime-sulfaméthoxazole sur *Listeria monocytogenes*. Ann Microbiol., (Institut Pasteur), 131B:267-276, 1980.

Tabela 3 - Distribuição porcentual da suscetibilidade de amostras de *Listeria* isoladas de várias fontes a 14 antimicrobianos.
Símbolos: * S - sensível PS - pouco sensível R - resistente.

Antimicrobianos	Fontes			Animal			Vegetal		
	Humana	PS	R*	S	PS	R	S	PS	R
Gentamicina	100,0	-	-	99,5	-	0,4	90,0	-	10,0
Sismicina	100,0	-	-	98,5	-	1,4	100,0	-	-
Cefalotina	96,5	1,1	2,3	97,5	0,4	1,9	90,0	-	10,0
Ampicilina	94,1	3,4	2,3	95,0	2,9	1,9	90,0	-	10,0
Sulfametoazol/									
Trimetoprim	91,8	2,3	5,8	97,5	0,4	1,9	90,0	-	10,0
Tetraciclina	91,8	1,1	6,9	91,0	3,9	4,9	100,0	-	-
Penicilina	90,6	5,8	3,4	87,6	4,9	7,4	90,0	10,0	-
Eritromicina	89,5	-	10,4	91,5	2,9	5,4	100,0	-	-
Kanamicina	83,7	4,6	11,6	94,0	2,9	2,9	90,0	10,0	-
Estreptomicina	82,5	3,4	13,9	87,1	9,4	3,4	100,0	-	-
Rifampicina	82,5	-	17,4	60,8	-	39,1	70,0	10,0	20,0
Dicloxacilina	81,3	4,6	13,9	74,2	14,8	10,8	100,0	-	-
Clindamicina	51,1	8,1	40,6	44,0	15,8	40,0	30,0	20,0	50,0
Cefoxitina	36,0	6,9	56,9	24,7	7,9	67,3	30,0	10,0	60,0

3. Donker-Voet, J. - A serological study of some strains of *Listeria monocytogenes* isolated in Michigan. Amer. J. Vet. Res., 20:176-179, 1959.
4. Hofer, E. - Estudo epidemiológico da ocorrência de portadores de *Listeria monocytogenes* entre operários de matadouros e indivíduos com distúrbios entéricos. Instituto de Veterinária - U.F.R.R.J. - Rio de Janeiro. p. 114, 1974. (Tese de Livre-Docência).
5. Hofer, E. - Pesquisa de *Listeria* spp em vegetal consumido pelo homem. In: Anais VI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Salvador, Bahia, p.192, 1975.
6. Hofer, E. - Bacteriologic and epidemiologic studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in healthy cattles. Zbl. Bakt. Hyg. A 256:175-183, 1983.
7. Hofer, E.; Pessôa, G.V.A. & Melles, C.E.A. - Listeriose humana. Prevalência dos sorotipos de *Listeria monocytogenes* isolados no Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 44:125-131, 1984.
8. Kawaler, B. & Hof, H. - Failure of cephalosporins to cure experimental listeriosis. J. Infection, 9:239-243, 1984.
9. Larsson, S.; Walder, M.H.; Cronberg, S.N.; Forsgren, A.B. & Moestrup, T. - Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from 1958 to 1982 in Sweden. Antimicrob. Agents Chemother., 28:12-14, 1985.
10. Reynaud, A.; Espaze, E.P.; Papin, S. & Courtieu, A.L. - Etude de la sensibilité aux antibiotiques de 139 souches de *Listeria* sérotypées par le Centre National de Référence en 1983. Ann Microbiol., (Inst. Pasteur) 135 B:331-339, 1984.
11. Rocourt, J.; Schrettenbrunner, A. & Seeliger, H.P.R. - Différenciation biochimique des groupes génomiques de *Listeria monocytogenes* (sensu lato). Ann Microbiol. (Inst. Pasteur) 134 A:65-71, 1983.
12. Rocourt, J. & Catimel, B. - Charaterisation biochimique de espèces du genre *Listeria*. Zbl. Bakt. Hyg. A., 260:221-231, 1985.
13. Seeliger, H.P.R. & Welshimer, H.J. - Genus *Listeria*. In: Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. - Bergey's manual of determinative bacteriology. 8th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, p.593-596, 1974.
14. Seeliger, H.P.R. & Höhne, K. - Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. In: Bergan, T. & Norris, J.R., eds - Methods in Microbiology. London, Academic Press, p.31-49, 1979.
15. Yersin, B.R.; Glauser, M.P. & Regli, F. - Infections à *Listeria monocytogenes* chez l'adulte. Schweiz Med. Wochenschr., 111:1956-1602, 1981.

A HUMAN FOOD POISONING OUTBREAK IN RIO DE JANEIRO CAUSED BY
SAUSAGE CONTAMINATED WITH ENTEROTOXIGENIC CLOSTRIDIUM PERFRINGENS
TYPE A

João Carlos de Oliveira Tórtora
& Altair Antunes Zebral

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

Summary

In January 1987 at least 13 people showed abdominal cramps and diarrhea after having eaten about 30 to 70 grams of a food-stuff (sausage) prepared with blood from calves. The outbreak occurred in Petrópolis City, in Rio de Janeiro State where the sausage was sold at a butcher shop and eaten either at home or in a snack-bar. Others may have eaten the implicated food and showed food poisoning symptoms as well. The symptoms presented by the patients and the incubation period and duration were compatible with those related to *Clostridium perfringens* type A. Samples from two kinds of sausage were examined and fecal specimens from three patients as well. Fourteen more individuals answered a questionnaire providing some personal data and many epidemiological information related to the outbreak. In the fecal specimens the number of enterotoxigenic *C. perfringens* cells per gram varied between 4.3×10^5 and 1.8×10^6 and in the sausage sample it was 6.8×10^6 . The total number of mesophiles in the sausage sample was 1.1×10^9 per gram. The number of gram-negative bacilli and staphylococci per gram in the sausage were, respectively, 7.4×10^8 and 2.0×10^5 . Attempt to isolate *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* was unsuccessful. The enterotoxigenic *C. perfringens* strains recovered either from sausage or fecal specimens showed serological identity and heat-resistance. Our results suggested that this outbreak was caused by *C. perfringens* type A.

Resumo

Um surto de toxinfecção alimentar humana, no Rio de Janeiro, causado por chouriço contaminado com *Clostridium perfringens* entero-toxigenico tipo A

Em janeiro de 1987, 13 pessoas apresentaram cólicas abdominais e diarréia após o consumo de 30 a 70 gramas de uma linguiça preparada com sangue bovino (chouriço). O surto ocorreu em Petrópolis, no Rio de Janeiro, onde a linguiça foi vendida em um açougue e consumida no lar ou em um bar-lanchonete desta cidade. É possível que outras pessoas também tenham consumido o alimento e apresentado a sintomatologia cujo tempo de incubação e duração foram compatíveis com os atribuídos a *C. perfringens* tipo A. Foi feito um estudo microbiológico de dois tipos suspeitos de linguiça bem como das fezes de três indivíduos que apresentaram sintomas. Ou-

etros 14 indivíduos responderam a um questionário fornecendo dados pessoais e epidemiológicos relacionados ao surto. Nas amostras de fezes o número de *C. perfringens* enterotoxigênico variou de $4,3 \times 10^5$ a $1,8 \times 10^6$ e na de chouriço foi de $6,8 \times 10^6$ por grama. No chouriço o número de mesófilos por grama foi $1,1 \times 10^9$, sendo $7,4 \times 10^8$ bacilos Gram negativos e $2,0 \times 10^5$ *Staphylococcus* sp. Não foram encontrados microrganismos dos gêneros *Salmonella* e *Shigella* nem *Staphylococcus aureus* ou *Bacillus cereus*. As amostras enterotoxigênicas de *C. perfringens* isoladas do chouriço e das fezes apresentaram identidade sorológica e termo-resistência. Os resultados encontrados sugerem que o surto tenha sido causado por *C. perfringens* tipo A.

Introduction

Clostridium perfringens type A has long been associated with human food poisoning outbreaks in different countries (2, 5, 7, 8, 10, 12). In Brazil, the frequency of a specific kind of microorganism in this illness is unknown. However, indirect evidences that *C. perfringens* may be a common cause of food poisoning among us have been presented. Serrano (8), Salzberg & col. (7) and recently Schocken-Iturrino & col. (10) have studied three cases reported in our country in which *C. perfringens* could be implicated. In these studies the symptoms presented by the patients, the incubation period and their duration associated to an increase of *C. perfringens* per gram in the feces were the main evidences of the involvement of this germ. However, Salzberg & col. (7) admitted the possibility that the outbreak that occurred in Campinas, SP, had been caused by another microorganism. Serrano (8) verified that some foods sold in Campinas had a large number of *C. perfringens* per gram and pointed out the sausage as the more contaminated one among the studied samples. Recent studies carried out by us on the frequency of enterotoxigenic *C. perfringens* in ground meat, soil and fecal specimens from healthy individuals, associated to climate and sanitary conditions as well, suggest that *C. perfringens* food poisoning may be frequent in Rio de Janeiro (9, 14). So far, a human food poisoning outbreak caused by *C. perfringens* with proven enterotoxigenicity and serological identity of the isolated strains has not been described in Brazil, although as suggested by Serrano (8), this fact may undoubtedly be due to insufficiency of study in this field. This paper reports a microbiological and epidemiological study on a human food poisoning outbreak involving at least 13 individuals who had eaten a sausage prepared with blood from calves. The outbreak occurred in Petrópolis City, in Rio de Janeiro State.

Material and Methods

Food and fecal specimens - Samples from two types of sausage were obtained from the butcher shop and the snack-bar in Petrópolis City, in Rio de Janeiro, where the patients had eaten them. One kind of sausage had been prepared with blood from calves and the other with viscera from pigs and calves. In the butcher shop the sausages were maintained at room-temperature. Fecal specimens from three patients were obtained one day after their symptoms had ended. Specimens from 14 other persons were not examined because they could not be contacted during the occurrence of the outbreak. However, they were inquired about their age, kind and amount of food eaten, symptoms, duration and incubation period of the illness. All the food samples and fecal specimens were transported to the laboratory under refrigeration and were examined one day after they had been received.

Number of bacteria in the food samples - In order to obtain dilutions from the food samples, 50 g from each were diluted by shaking in 450 ml of a 0.1% sterile peptone water. Other dilutions were made and 1 ml from each was plated on the depth of Standard Methods agar for mesophiles counting. The plates were incubated at 37°C for

48 hr. The number of *C. perfringens* per gram was determined in SPS agar (BBL) as described by Angelotti & col. (1). Mannitol salt agar (BBL) was used to count staphylococci while EMB agar (Difco) was employed to count gram-negative bacilli. In attempt to isolate *Salmonella* sp and *Shigella* sp we used SS agar (Difco). In order to isolate these two last microorganisms the SS agar plates were either directly struck from 10^{-1} diluted suspensions or after a broth enrichment at 37C for 24 hr.

Number of *C. perfringens* in the fecal specimens - Fecal specimens weighing 1 g were suspended in 9 ml of a sterile NaCl (0.85% w/v) solution and, after having been shaken they were heated at 80C for 10 min in a water bath. Then, serial dilutions between 10^{-2} to 10^{-6} were made and 1 ml from each suspension was spreaded on the surface of 1% glucose blood agar plate and incubated anaerobically at 37C for 24 hr in a 80% N₂, 10% CO₂ and 10% H₂ atmosphere. In attempt to isolate *Bacillus cereus* some plates were struck either from heated food or fecal 10^{-1} diluted suspensions and incubated aerobically at 37C for 48 hr. The colonies showing characteristics of *C. perfringens* were numbered and the result was reported as the number of sporulated *C. perfringens* cells per gram. Some colonies were picked from the plates to chopped meat medium (CMM) and after incubation at 37C for 20 hr their biochemical characteristics were determined.

Biochemical and serological identification - The identification of the staphylococci strains was made by microscopic examination, coagulase and mannitol fermentation tests. The search for *Salmonella* and *Shigella* bacilli was made by microscopic examination, lactose fermentation in agar plate medium and agglutination with polyvalent antisera. The *C. perfringens* strains were identified as previously described (15). In attempt to isolate *Bacillus cereus* some colonies were picked from aerobically incubated glucose blood agar medium and examined under phase contrast microscopy and after Gram staining.

Enterotoxin synthesis and detection - The enterotoxin synthesis in *C. perfringens* strains was evaluated in supernatant fluid from sporulated cultures grown in the Törtora's medium (13). The lethal effect in mice (6) and the microslide double immunodiffusion (11) tests were used for this purpose. Neutralization of the lethal effect of the enterotoxin was made in mice by using enterotoxin anti-serum added to supernatant fluid according to Stark & Duncan (11).

Agglutination test and typing of *C. perfringens* strains - Antisera against two *C. perfringens* strains isolated in this study from fecal specimens were obtained using overnight cultures grown in glucose-CMM at 37C. The cultures were washed for three times in sterile saline, resuspended to their original volume and added to 0.5% formol. After 24 hr they were once more washed and suspended in sterile saline without formol. Rabbits weighing about 2 kg, previously examined for the presence of agglutinins, were intravenously inoculated with 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 ml using a particular suspension. The doses were given at two day intervals. In the 15 th day the sera were obtained. Slide agglutination test employing the *C. perfringens* strains recovered either from food samples or fecal specimens was performed using a drop of each suspension from cultures grown overnight in glucose-CMM, washed with sterile saline and a drop of 1/5 diluted antisera. The enterotoxigenic *C. perfringens* strains NCTC 8798 and Cl. 4180 were employed as negative control to this test. The typing of *C. perfringens* strains on basis on their capacity to synthesize toxins was carried out as described by Dowell and Hawkins (3).

Heat-resistance - In order to test the heat-resistance of the enterotoxigenic *C. perfringens* strains, sporulated cells were obtained as suggested by Törtora (13). One milliliter was pipetted from the sporulated cultures to the bottom of glucose-CMM that was heated at 100C for 1 hr in a water bath. After heating, the tubes were incubated at 37C for 24 hr when the growth was evaluated by the gas production and phase-contrast microscopy.

Results

The main epidemiological factors associated to persons involved in this outbreak are represented in Table 1. The patients showed abdominal cramps and diarrhea within 10 to 14 hr incubation period. None had emesis or fever. The duration of the symptoms was about 24 to 48 hr. The types and number of microorganisms per gram in the two types of food samples are shown in Table 2. Among the *C. perfringens* strains isolated from the sausage A, all synthesized enterotoxin, but none from sausage B did so. All but two *C. perfringens* strains isolated from fecal specimens synthesized enterotoxin (Table 3). The antisera obtained against two enterotoxigenic *C. perfringens* strains isolated in this outbreak were able to agglutinate all the enterotoxigenic *C. perfringens* strains recovered either from food samples or fecal specimens. All the enterotoxigenic *C. perfringens* strains were classified as type A and presented heat-resistant spores. From the gram-negative bacilli group, fifteen lactose-negative strains were isolated but none of them showed biochemical or serological characteristics related to *Salmonella* or *Shigella*. Seven cultures of staphylococci were obtained but none of them was identified as *S. aureus*. The blood agar plates aerobically incubated showed no colonies with characteristics related to *Bacillus cereus*.

Discussion

In January 1987, a shortage of food from animal origin in Brazil, induced the people to buy a few from unsafe sources, which were prepared without due sanitary care. The food implicated in this outbreak showed microorganisms whose types and number permit us to suppose that it was prepared and preserved under sausages were bought at the butcher shop and the snack-bar where they were maintained at room-temperature, exposed to insects and dust and manipulated with frequency, which certainly increased the total number of mesophiles, mainly in the blood-containing sausage. All the isolated enterotoxigenic *C. perfringens* strains were heat-resistant and they could be selected by the technic employed in the preparation of the sausages and the others bacteria could be late contaminants. The number of *C. perfringens* per gram obtained by us either in the sausage samples or in the fecal specimens are in accordance to that described by Serrano (8) during an outbreak in Campinas, SP. The two types of sausage analysed in our laboratory showed a sufficient number of microorganisms to trigger intestinal symptoms in the consumers. However, our data may be greater than those that really occurred at the day before, when the sausages were eaten. The failure in isolate from the

Table 1 - Epidemiological data related to the persons involved in the outbreak.
Symbols: 1. sausage prepared with blood from calves (chouriço); 2. sausage prepared with viscera from pigs and calves.

Number of persons	kind of food eaten	amount of food eaten (g)	heating before eating	symptoms of food poisoning	age variation
13	A ¹ , B ²	30 to 70	-	+	17 to 65
2	A , B	30 to 50	+	-	45 to 62
2	B	30 to 50	-	-	8 to 56

Table 2 - Kind and amount of microorganisms per gram in the sausage samples.
Symbols: 1. sausage prepared with blood from calves (chouriço); 2. sausage prepared with viscera from pigs and calves.

sausage	mesophiles	microorganisms per gram (X 10 ⁶)				
		Clostridium perfringens	gram-neg bacilli	Salmonella Shigella	staphylococci	Bacillus cereus
A ¹	1100	6.8	740	-	0.2	-
B ²	370	0.003	172	-	-	-

Table 3 - Number of *C. perfringens* per gram in the sausage samples and in the fecal specimens.
Symbols: 1. sausage prepared with blood from calves (chouriço); 2. sausage prepared with viscera from pigs and calves.

samples and specimens	sporulated cells/g (X 10 ⁶)	number of strains isolated	number of enterotoxigenic strains (%)
sausage A ¹	6.8	9	9 (100)
sausage B ²	0.003	4	0 (0)
feces (F ₁)	1.8	8	8 (100)
feces (F ₂)	0.43	4	4 (100)
feces (F ₃)	0.8	6	4 (66)
Total 05	-	31	25 (80)

viscera-containing sausage samples and the absence of any symptom in a child and in an adult who had eaten this food without previous heating, led us to conclude that either the blood-containing sausage was the gram-negative bacilli flora was not able by itself to develop those food poisoning symptoms. The epidemiological data firstly obtained from this outbreak suggested us that this food poisoning was caused by *C. perfringens* type A and the microbiological study confirmed this. Recent work carried out by Harmon & col. (4) in the USA corroborated that the enumeration of spores in the fecal specimens in addition to the hemolytic activity and heat-resistance tests are a reliable means for diagnosis of *C. perfringens* outbreaks. However, we think that the diagnosis of the outbreak caused by this microorganism involving a little number of individuals and those without a sufficient number of fecal specimens for analysis should be also established by the characterization of the enterotoxigenicity of the isolated strains and mainly by the serological identity among them. The few studies carried out in Brazil about the number of *C. perfringens* in the fecal specimens from healthy and unhealthy individuals are in agreement with that described in the USA. Nevertheless, we have found a greater number of intestinal carriers of both heat-resistant or enterotoxigenic *C. perfringens* among health individuals living in Rio de Janeiro (14) than those related to the people from other countries. It also has been described a number of healthy intestinal carriers with a greater number of *C. perfringens* than that found in some unhealthy individuals (8,10). In the developing countries, intestinal disorders are frequent among people and their influence on the kind and on the number of intestinal microorganisms is unknown. The serological study has been difficulted by the increasing of serotypes and because only laboratories around the world can make their recognition. For a practical purpose the agglutination test may be carried out by employing antisera obtained against some selected strains isolated from the suitable outbreak. It was not possible yet to show a greater involvement of some serotypes in the outbreaks caused by this microorganism. Therefore, the main interest for diagnosis is to characterize the serological identity among the strains from different sources. On basis in the epidemiological data related to the patients, the number of *C. perfringens* per gram in the fecal specimens and in the sausage samples, the heat-resistance and the enterotoxigenicity of the isolated strains, and mainly the serological identity among all isolated strains from different sources and the absence of another suspicious microorganism as well, we concluded that this food poisoning outbreak was caused by *C. perfringens* type A and the implicated food was the blood-containing sausage.

Acknowledgement

We thank Venâncio Bomfim for his technical assistance during the immunization and Dr Lélis Borges do Couto for his critical review of the manuscript. rabbits the

References

1. Angelotti, R.; Hall, H.E.; Foter, M.J. & Lewis, K.H. - Quantitation of *Clostridium perfringens* in foods. *Appl. Microbiol.*, 10:193-199, 1962.
2. Daver, C.C. - 1960 Summary of disease outbreaks and a 10 year résumé. *Public Health Rep.*, 76:915-924, 1961.
3. Dowell, V.R. & Hawkins, T.M. - Laboratory methods in anaerobic bacteriology. NCDC Laboratory Manual. D.H.E.W. Publ. No. 74-8272. U.S. Government Printing Office, Washington, D.C. 1974.
4. Harmon, S.M.; Kautter, D. A. & Hatheway, C.L. - Enumeration and characterization of *Clostridium perfringens* spores in the feces of food poisoning patients and normal controls. *J. Food Protec.* 49:23-28, 1986.
5. Hayashi, K.; Kugita, Y.; Tawara, M. & Yamagata, H. - A food-poisoning incident

- of a family caused by *Clostridium welchii* Hobbs type 6. Bull. Nagasaki Uni., 2:87-90, 1961.
6. Sakaguchi, G.; Uemura, T. & Riemann, H.P. - Simplified method for purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. Appl. Microbiol., 26:762-767, 1973.
7. Salzberg, S.P.; Massagué, P.R. & Serrano, A.M. - Estudo epidemiológico e microbiológico de um surto de intoxicação alimentar. Rev. Microbiol. (S.Paulo), 13:26-30, 1982.
8. Serrano, A.M. - Incidência de *Clostridium perfringens* em alimentos, um surto de intoxicação e evidenciação da prova de lecitinase. S. Paulo, Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Univ. Estadual de Campinas, 1976.
9. Sousa, T.L. & Tórtora, J.C.O. - *Clostridium perfringens* enterotoxigênico em carne moída bovina no Rio de Janeiro. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 17:356-363, 1986.
10. Schocken-Iturrino, R.P.; Ávila, S.A.; Nader Fº., A.; Rossi Jr., O.D. & Martins, O. - Food-borne intoxication by *Clostridium perfringens*. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 17:228-233, 1986.
11. Stark, R.L. & Duncan, C.L. - Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. Infect. Immun., 4:89-96, 1971.
12. Sutton, R.G.A. & Hobbs, B.C. - Food poisoning caused by heat-sensitive *Clostridium welchii*. A report of five recent outbreaks. J. Hyg. Cambridge, 66:135-146, 1968.
13. Tórtora, J.C.O. - Alternative medium for *Clostridium perfringens* sporulation. Appl. Environ. Microbiol., 47:1172-1174, 1984.
14. Tórtora, J.C.O. & Costa, G.A. - The suitability of Tortora's medium for the production of enterotoxin in *Clostridium perfringens* strains. Microbiol. Immunol., 29:509-516, 1985.
15. Tórtora, J.C.O.; Pinheiro, M.S. & Pitard, M.C. - Biochemical differentiation between enterotoxigenic heat-sensitive and heat-resistant *Clostridium perfringens* strains. Microbiol. Immunol., 30:89-95, 1986.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS: FAGOTIPAGEM DE AMOSTRAS DE PORTADORES BOVINOS EM LACTAÇÃO

Maria Lúcia Cavalieri de Araújo

Marta Schiavone Cardoso

Maria Emilia Bodini Santiago

João Luciano Andrioli

Dept. de Microbiologia

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias

Campus de Jaboticabal - UNESP

14870 Jaboticabal SP, Brasil

& Izabel Ioko Ito

Dept. de Ciências da Saúde

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP

Campus de Ribeirão Preto

14100 Ribeirão Preto SP, Brasil

Resumo

Estudo preliminar sobre fagotipagem em amostras de *S. aureus* isoladas de bovinos aparentemente saudáveis em lactação, elaborado com os conjuntos básicos para amostras de origem bovina e humana. Caracterização de fagótipos e grupos de fagótipos mais frequentes.

Summary

Staphylococcus aureus: phage typing in samples of bovine carriers in lactation period

Preliminary studies of typing phage in samples of *S. aureus* isolated from bovine apparently healthy in lactation period. The tests were made using the basic collection for samples of human and bovine origin. Characterization of fagotype and groups of fagotype most frequently.

Introdução

Vários microrganismos dentre eles o *Staphylococcus aureus* assumem importância em Medicina Humana e Veterinária por sua implicação em ambientes hospitalares, na indústria de alimentos, nas moléstias infeciosas dos animais pelo elevado prejuízo que acarretam e pela importância na transmissão ao homem.

Neste particular, as mamites bovinas, infecções agudas ou crônicas do úbere aparecem como destaque uma vez que o *S. aureus* é agente etiológico frequente, levando o animal à perda ou diminuição drástica da capacidade de produção de leite, bem como à veiculação de microrganismos patogênicos.

O isolamento de cepas de animais aparentemente saudáveis (portadores) pode ser de grande importância notadamente em áreas onde as mastites estafilococicas tem caráter endêmico pois a identificação e caracterização deste microrganismo pode levar à determinação das possíveis fontes de infecção, vias de disseminação e as diferentes linhagens do microrganismo que poderia refletir diretamente na epidemiologia.

Cabe ainda ressaltar, que para amostras de origem bovina a fagotipagem em nosso

país, é uma prova que somente recentemente tem sido utilizada. Este trabalho objetiva obter dados sobre a tipabilidade das cepas isoladas de animais aparentemente saudáveis frente aos Conjuntos Internacionais de Fagos para amostras de origens humana e bovina, bem como, dados sobre a freqüência dos fagótipos encontrados e de seus grupos.

Material e Métodos

As cepas submetidas à fagotipagem foram isoladas de 24 animais, fêmeas em lactação da espécie bovina, animais estes que apresentavam uma produção média diária de 15 litros de leite.

De cada animal foram colhidas três amostras, sendo uma das fossas nasais (FN) e duas do úbere, antes (UA) e depois (UD) de higiene pré-ordenha.

O número total de cepas foi 55, sendo uma cepa isolada das fossas nasais, 15 isoladas de UA e 39 isoladas de UD.

A caracterização das amostras de *S. aureus* baseou-se nas provas de plasmocoagulase em tubo e em lâmina, Prova de Lecitinase e Prova de Desoxirribonuclease (DNase), procedimentos descritos em ARAUJO, 1986 (1).

A fagotipagem foi realizada segundo o método de BLAIR & WILLIAMS, 1961 (2) com os fagos recomendados pelo Subcomitê Internacional de Fagotipagem denominado "set basic" para amostras de origens humana e animal (quadros 1 e 2).

Quadro 1 - Conjunto Básico
Internacional de fagos para amostras de origem humana.

Grupos	Fagos
I	29/52/52A/79/80
II	3A/3C/55/71
III	6A/42E/47/53/54/75/77/83A/84/85
IV	94/95/96
Não Classificado	81

Quadro 2 - Conjunto Básico internacional de fagos para amostras de origem bovina.

Grupos	Fagos
I	29/52A
II	3A/116
III	6/42E/53/75/84
IV	42D/102/107/117
Miscelânia	78/118/119

Resultados e Discussão

Das 56 cepas testadas, levando-se em consideração os dois conjuntos utilizados, 35 foram tipáveis a 1xRTD, uma foi tipável a 100xRTD e 20 foram não tipáveis, (Tabela 1).

Com o conjunto básico para amostras de origem bovina, 34 amostras foram tipáveis e com o conjunto humano 36, pois duas amostras foram tipáveis apenas com os fagos do conjunto humano.

Considerando-se as amostras provenientes dos diferentes nichos, podemos observar que 100% das amostras de FN e de UA foram tipáveis pelos fagos utilizados que poderiam então, segundo SOLE-VERNIN (comunicação pessoal), 1973, serem considerados satisfatórios, uma vez que tiparam mais de 80% das cepas testadas, o mesmo não acontecendo com amostras UD cujas tipáveis foram 20 (50,0%) das quais, 19 a 1xRTD e 01 a 100xRTD.

Dos 24 animais utilizados apenas um apresentou *S. aureus* nas fossas nasais que na fagotipagem mostrou frente ao "set" básico para amostras de origem bovina a 1xRTD o fagótipo 75/84 do grupo III. Quando analisada frente ao "set" básico para amostras de origem humana a 1xRTD o obtido foi 75/77/79/81/83A/84/94/96 grupos I/III/IV/NC.

As amostras de *S. aureus* UA ou seja, úbere antes, foram isoladas de sete animais (29,2%) num total de 15 cepas, antes da fagotipagem.

O resultado da prova revelou que nenhuma das amostras foi tipável com fagos, exclusivamente do "set" bovino enquanto que uma foi tipável apenas com fago 47 componente exclusivo do "set" humano.

Quando analisamos separadamente os resultados obtidos com dois conjuntos a 1xRTD observamos que para o bovino (Tabela 1) cinco cepas apresentaram fagótipos 53/84 do grupo III, sendo consideradas apenas uma, pois foram isoladas de um mesmo animal. O fagótipo mais frequente foi o 6/42E/102/117 dos grupos III/IV em associação, ocorrendo seis vezes em cinco animais sendo um mesmo animal portador de duas cepas com o mesmo fagótipo consideradas a partir de então apenas uma. Em se considerando que uma das amostras isoladas do animal nº 24 foi não tipável a 100xRTD o número de cepas caracterizadas pela fagotipagem foi nove (9).

Frente ao "set" humano o fagótipo mais frequente foi o 53/77/83A/84/85/95 grupos III/IV ocorrendo

em três cepas provenientes de um mesmo animal sendo, portanto, uma única cepa, tendo o mesmo acontecido com o animal nº 24, cujas cepas isoladas apresentaram o fagótipo 6/42E/47 duas vezes. Também uma cepa apresentou-se tipável apenas com o fago 47 componente exclusivo deste "set". Para as amostras UA a fagotipagem caracterizou onze (11) cepas.

As amostras provenientes de UD foram isoladas de oito animais num total de 40. Nenhuma delas foi tipável com fagos exclusivamente do conjunto bovino, entretanto uma amostra foi tipável a 100xRTD com os fagos 94/95 componentes exclusivos do conjunto básico humano.

Frente ao conjunto básico bovino o fagótipo mais frequente foi o 6/42E/102/117 do grupo III/IV que tipou dez (10) cepas oriundas de 8 animais, seguido do 53/84 do grupo III que tipou sete (7) cepas de um só animal consideradas, portanto como uma única.

Com o "Set" básico humano o 6/42E/47 do grupo III foi o fagótipo de 10 cepas isoladas de 8 animais constituindo-se como o mais frequente.

Do total de amostras UD apenas a metade foi tipada por ambos os conjuntos utilizados, os quais, provavelmente não estão adequados, uma vez que não atingiram 80% das cepas testadas.

Destes resultados obtidos devemos notar a elevada frequência de tipabilidade pelos fagos dos grupos III e III/IV em associação, abrangendo todas as cepas testadas que foram tipáveis e a não ocorrência dos grupo II, fatos estes comuns aos dois conjuntos utilizados.

Chama-nos também a atenção duas cepas tipáveis exclusivamente com fagos do conjunto humano (47 e 94/95)

Conclusão

Conforme ressaltado anteriormente dados sobre fagotipagem de amostras de origem bovina são escassos e não nos permitem ainda qualquer conclusão definitiva.

Tabela 1 - Resultados obtidos na fagotipagem com o conjunto internacional de fagos para amostra de origem bovina.

Nº Nicic	Nº do animal	Nº cepas antes fa- gotipagem	Fagotipagem		Grupo	NT	Nº cepas após fa- gotipagem
			1xRTD	100xRTD			
FN	19	01	75/84	-	III	-	01
UA	03	05	53/84	-	III	-	01
	18	01	6/42E/102/117	-	III/IV	-	01
	19	01	6/42E/117	-	III/IV	-	01
	21	01	53	-	III	-	01
	21	01	6/42E/102/117	-	III/IV	-	01
	22	01	6/42E/102/117	-	III/IV	-	01
	23	01	6/42E/102/117	-	III/IV	-	01
	24	02	6/42E/102/117	-	III/IV	-	01
	24	01	6/42E/102/107	-	III/IV	-	01
	24	01	NR	NT	-	01	01
UD	03	20	NR	NT	-	20	20
	03	07	53/84	-	III	-	01
	03	01	53/75/84	-	III	-	01
	03	01	6/53/75/84/78	-	III/Misc.	-	01
	03	01	6/53/84	-	III	-	01
	03	01	6/42E/102/117	-	III	-	01
	11	01					01
	13	01					01
	15	01	6/42E/102/117	-	III/IV	-	01
	19	01					01
	21	01					01
	22	03					01
	24	01					01

Entretanto os resultados do presente trabalho em associação com outros, elevando o número de cepas testadas, poderão caracterizar as amostras, possibilitando assim uma provável contribuição ao estudo epidemiológico das mamites por estafilococos.

Tabela 2 - Resultados obtidos na fagotipagem com o conjunto internacional de fagos para amostra de origem humana.

Nicho	Nº do animal	Nº cepas antes fa-gotipagem	1xRTD	100xRTD	NT	Nº cepas após fa-gotipagem	
FN	19	01	75/77/79/81/83A/84/94/96	-	III/IV/NC	-	01
UA	03	01	53/84/85/95	-	III/IV	-	01
	03	01	53/54/77/83A/84/85/95	-	III/IV	-	01
	03	03	53/77/83A/84/85/95	-	III/IV	-	01
	18	01	6/42E/47	-	III	-	01
	19	01	6/42E/47/81	-	III/NC	-	01
	21	01	53/54/77/84/85	-	III	-	01
	21	01	6/42E/47	-	III	-	01
	22	01	6/42E	-	III	-	01
	23	01	6/42E	-	III	-	01
	24	01	6/42E	-	III	-	01
	24	02	6/42E/47	-	III	-	01
	24	01	47	-	III	-	01
UD	03	19	NR	NT	-	NT	19
	03	01	NR	94/95	III/IV	-	01
	03	01	53/84/85/95	-	III/IV	-	01
	03	01	53/54/75/83A/84/85/95	-	III/IV	-	01
	03	01	6/53/54/75/77/84	-	III	-	01
	03	01	53/84/85	-	III	-	01
	03	01	53/84/85/95	-	III	-	01
	03	01	53/84	-	III	-	01
	03	01	53/77/83A/84	-	III	-	01
	03	01	6/42E/47	-	III	-	01
	03	01	6/53/54/77/84/85/95	-	III/IV	-	01
	03	01	53/54/84/85/95	-	III/IV	-	01
	11	01					01
	13	01					01
	15	01					01
	19	01	6/42E/47	-	III	-	01
	21	01					01
	22	03					01
	24	01					01

Agradecimentos

Os autores agradecem à Profa. Dra. Ana Maria Uthida Tanaka, à Profa. Dra. Maria Aparecida de Araújo e à Sra. Olga de Castro do Laboratório de Estafilococos, Seção de Fagotipagem do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, pela elaboração da Fagotipagem.

Referências Bibliográficas

1. Araujo, M.L.C. de; Ito, I.Y.; Santiago, M.E.B.; Cardoso, M.S. & Cunha, E.C.da. - *Staphylococcus aureus*: Pesquisa de Portadores Bovinos em Lactação e Antibiograma das Cepas Isoladas. Rev. Microbiol., 17(4):350-355, 1986.
2. Blair, J.R. & Williams, R.E.O. - Phage typing of staphylococci. Bull. Med. Hth Org., 24:771-784, 1961.

FATORES DE VIRULÊNCIA DE AMOSTRAS URINÁRIAS DE *ESCHERICHIA COLI*

Darci Satsuki Aoki Watanabe

Regina Maria Santinho Tosoni Decarlis

Lourival Antonio Michelin

Depto de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biociências

Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu

18600 Botucatu SP, Brasil

& Augusto Cezar Montelli

Depto de Clínica Médica

Faculdade de Medicina

Universidade Estadual Paulista - Campus de Botucatu

18600 Botucatu SP, Brasil

Resumo

Em 248 amostras de *E. coli* isoladas de urinoculturas positivas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu foram pesquisados a produção de hemolosinas (semeadura em placas de ágar-sangue desfibrinado de carneiro) e os tipos de hemaglutinação (HA), manose sensível (MS) e manose resistente (MR). Relacionou-se estas características com os sorogrupos envolvidos nesse processo. Apresentaram hemólise 132 amostras (53,2%), destacando-se sobretudo os sorogrupos 018ac (38 amostras - 88,4%), 06 (66 - 80,5%) e 04 (20 - 74,1%). Houve MSHA em 232 amostras (93,5%), MRHA em 85 (34,3%) e ambos os tipos em 78 (31,4%). A análise dos dados revelou relação significativa na distribuição de hemólise, MRHA e HA(MS + MR) e os sorogrupos. Das 85 amostras MRHA, 62 (73%) caracterizaram-se por produzir hemólise, demonstrando que as duas características associam-se, especialmente aos sorogrupos 018ac (81,4%) e 04 (63%), o que não ocorreu entre amostras MSHA. Observou-se que entre as bactérias com MRHA, 92% também possuíam MSHA, estando implicados principalmente os sorogrupos 018ac (69,8%) e 04 (63%). A presença concomitante de hemolisinas e adesinas MR e MS nos sorogrupos prevalentes de infecção urinária, em nosso meio, sugere que estas amostras possuem vantagens seletivas para o crescimento e sobrevida na mucosa urogenital.

Summary

Virulence factors of urinary Escherichia coli strains

Hemolysin production (tested on agar 7% sheep blood plates) and the hemagglutination (HA) patterns, manose sensitive (M.S.) and manose-resistant (M.R.) were researched in 248 *E. coli* strains with significative urine culture from patients of the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu. These characteristics were related to the serogroups involved in this process. One hundred and thirty two strains (53,2%) showed hemolysin production, more easily found in the serogroups 018ac (38 strains, 88,4%), 06 (66 - 80,5%) and 04 (20 - 74,1%). Two

hundred and thirty two strains (93,5%) were MSHA, 85 (34,3%) were MRHA and both types in 78 (31,4%). Analysis of the data showed significative relation in the hemolysis distribution, MRHA, (MS + MR) HA and the serogroups. Among 85 MRHA strains, 62 (73%) were hemolytic, indicating that the two characteristics were associated especially in the serogroups 018ac (81,4%) and 04 (63%), but it has not occurred in the MSHA strains. It was observed that in the MRHA strains 92% were also MSHA, mainly the serogroups 018ac (69,8%) and 04 (63%). Adhesins concurrently with MR, MS and hemolysin production in the prevalents serogroups of urinary infection suggest that these strains have selective advantage concerning growth and survival in the uroepithelial cells.

Introdução

Escherichia coli, embora constitua fração importante da flora normal intestinal, é considerado patógeno oportunista, capaz de colonizar e subsequentemente causar infecções intestinais e extra intestinais, como septicemia, meningite, infecções do trato urinário, etc. Em virtude de sua importância clínica, a *E. coli* tem sido objeto de numerosas pesquisas com intuito de definir os seus possíveis fatores de virulência. Vários autores (1, 2) têm observado que a virulência de *E. coli* é multifatorial, sendo que algumas propriedades estariam ligadas primariamente a amostras virulentas. Uma destas seria a habilidade de produzir hemolisinas.

A associação de *E. coli* hemolítica com infecção urinária tem sido documentada há anos por diferentes autores. Assim, em 1917, Lyon (19) mencionou implicações deste microrganismo como agente causal de cistite e Dugeon & col. (4) em 1927, sugeriram que a atividade hemolítica poderia ser fator importante para virulência da *E. coli* no trato urinário.

Outros pesquisadores têm mostrado que *E. coli* hemolítica frequentemente hemaglutina diferentes tipos de eritrócitos (11, 16, 18, 20), possui fimbria e抗ígenos K (12, 16). Hughes & col. (16) relataram que amostras de *E. coli* com alto potencial de virulência para o trato urinário, geralmente, são hemolíticas, resistentes ao soro, tóxicas para camundongos, aderem a células do trato urinário e causam hemaglutinação manose-resistente. A aderência à célula epitelial é um dos principais fatores de virulência e uma das características de amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com pielonefrite. O teste quantitativo da aderência às células uroepiteliais é difícil de se realizar, enquanto que a aglutinação de eritrócitos é uma reação facilmente medida e muito usada em Microbiologia Clínica. Duguid & Old (6) demonstraram que a aderência correlaciona-se extremamente bem com a aglutinação de eritrócitos. Segundo Hanley & col. (14) a aderência é medida por pili ou adesina e, de modo geral, são classificados em manose sensível (MS) ou manose resistente (MR), dependendo da habilidade ou não da manose em inibir a ligação da *E. coli* a eritrócitos e às células epiteliais. A ligação MS é mediada pelo pili do tipo 1, que causa, characteristicamente, aglutinação de eritrócitos de cobaio e de glicoproteínas urinárias denominadas de Tamm-Horsfall. Esses pili estão presentes em amostras de *E. coli* comensal e patogênica. A ligação MR causa aglutinação de eritrócitos humanos na presença de manose, sendo usualmente codificada no cromossoma da célula bacteriana, cujos genes determinam a produção da proteína P pilus, P fimbrias ou Pappilus. A capacidade de amostras de *E. coli* em aglutinar eritrócitos humanos constitui um bom marcador de virulência.

Mesmo que trabalhos já tenham sido realizados neste sentido, consideramos oportuna a verificação de alguns fatores de virulência de *E. coli* em nosso meio (como a produção de hemolisina e os tipos de hemaglutinação MS e MR apresentados por amostras isoladas de pacientes com infecção urinária) e o relacionamento dos mesmos com os principais sorogrupo envolvidos neste processo.

Material e Métodos

Pesquisou-se a produção de hemólise e os tipos de hemaglutinação em 248 amostras de *Escherichia coli*, isoladas da urina de pacientes internados ou atendidos em ambulatório no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, com urocultura positiva, segundo o critério de Kass (17).

Para pesquisa da produção de hemolisinas as amostras foram semeadas em placas de agar sangue contendo 7% de sangue desfibrinado de carneiro. Após 18 horas de incubação à 37°C, verificou-se a presença ou não de um halo total de hemólise ao redor das colônias.

Os testes de hemaglutinação (HA) foram realizados frente a eritrócitos de cobaio, com e sem a adição de 0,5% de manose, de acordo com a metodologia preconizada por Duguid & Gills (5) e paralelamente, com eritrócitos humanos (tipo A, Rh positivo), com e sem a adição de 1% de manose, conforme Evans & Evans (7).

As amostras foram anteriormente sorogrupoadas, segundo Watanabe & col. (24).

A análise da relação entre os dados dos fatores de virulência e os sorogrupo foi realizada pelo teste da homogeneidade das distribuições multinomiais (χ^2 de Goodmann) e as diferenças de proporções foram testadas pelos χ^2 de Pearson (10). Os resultados significativos são referidos pela presença de "asterisco" acima do número.

Resultados e Discussão

Foram pesquisados em 248 amostras de *E. coli* isoladas de pacientes com infecção urinária alguns fatores de virulência como a produção de hemolisinas e a capacidade de aglutinar eritrócitos humanos e de cobaio. A Tabela 1 mostra que das 248 cepas, 132 (53,2%) apresentaram hemólise; 232 amostras (93,5%) expressaram hemaglutinação manose sensível (MS) com hemácias de cobaio; 85 (34,3%) revelaram HA manose resistente (MR) com eritrócitos humanos e 78 (31,4%), ambos os tipos de HA (MS+MR). A análise estatística dos dados mostrou relação significativa na distribuição de hemólise, de hemaglutinação MR e (MR+MS) em relação aos sorogrupo. A distribuição significativa (53,2%) de amostras hemolíticas ocorreu em virtude do encontro de elevadas frequências de cepas produtoras de hemolisinas nos sorogrupo 018ac (38 amostras - 88,4%), 06 (66 amostras - 80,5%) e 04 (20 amostras - 74,1%), participando o 01, 02 e 07 em menor número. Brooks & col. (1) obtiveram resultados semelhantes ao detectar 43% de amostras hemolíticas, principalmente dos sorogrupo 06 (85%) e 04 (82%). Cooke & Ewins (3) demonstraram 44% e Minschew & col. (20), 49%. Estudos posteriores (8, 15, 22) confirmaram a alta incidência de *E. coli* hemolítica na urina de pacientes com infecção urinária e sobretudo sua associação com determinados sorogrupo como 04, 06, 018ac, 075 e outros.

Apesar do conhecimento de que o sorogrupo 075 corresponda a amostras produtoras de hemólise, encontramos em nossa pesquisa 26 cepas, todas não hemolíticas. Este fato, segundo Van Den Bosch & col. (23) pode ser devido a variações de sorogrupo, uma vez que a propriedade de produzir hemólise está ligada apenas ao sorogrupo 075:K95 e não ao 075:K100.

Aliada à produção de hemolisinas, as *E. coli* urinárias podem aderir-se às células uroepiteliais e determinar a hemaglutinação MR de eritrócitos humanos. Na Tabela 2, observa-se que 85 amostras apresentaram MRHA, das quais 62 (73%) se caracterizaram

Tabela 1 - Produção de hemólise e tipos de hemaglutinação apresentados pelas amostras dos diferentes sorogrupo de *E. coli*.

Sorogrupo	Total amostras	Hemólise positiva		Hemaglutinação positiva					
		Nº	%	MS		MR		MS + MR	
				Nº	%	Nº	%	Nº	%
06	82	66 (80,5)	81 (98,8)	17	(20,7)	17	(20,7)	17	(20,7)
018ac	43	38 (88,4)	38 (88,4)	35	81,4	30	(69,8)		
04	27	20 (74,1)	26 (96,3)	17	(63,0)	17	(63,0)		
02	27	5 (18,5)	26 (96,3)	2	(7,4)	2	(7,4)		
01ab	12	2 (16,7)	10 (83,3)	2	(16,7)	1	(8,3)		
07	24	1 (4,2)	21 (87,5)	5	(20,8)	4	(16,6)		
08	2	0 (0)	2 (100,0)	1	(50,0)	1	(50,0)		
09	1	0 (0)	1 (100,0)	0	(0,0)	0	(0,0)		
011	4	0 (0)	4 (100,0)	1	(25,0)	1	(25,0)		
075	26	0 (0)	23 (88,5)	5	(19,2)	5	(19,2)		
Total	248	132 (53,2)	232 (93,5)	85 (34,3)	78 (31,4)				
Análise		$\chi^2=409,27*$	$\chi^2=10,59$	$\chi^2=116,65*$	$\chi^2=76,78*$				

por produzir hemólise. A análise desses dados revelou associação significativa entre as características estudadas: presença de hemolisina e de adesina MR. Estes achados corroboram a afirmativa de Evans e col. (8) ao relatarem íntima correlação entre amostras MRHA e a produção de hemolisinas: 89% das amostras MRHA produziram hemólise. Nesse sentido, O'Hanley & col. (21), também mostraram que estípites de *E. coli* pielonefritogênicas agrupam-se em poucos sorotíplos O, elaboram alfa hemolisina, exibem MRHA e possuem normalmente adesiva gal-gal. Na Tabela 1 constatamos que os sorogrupo 018ac e 04 expressaram elevada proporção de hemaglutininas MR, respectivamente, 81,4% e 63%, caracterizando-se também como estípites hemolíticas em sua maioria (88,4% e 74,1%). As amostras de sorogrupo 06, embora com menor proporção de adesina MR (20,7%) foram principalmente hemolíticas (80,5%). A prevalência desses sorogrupo em nosso meio, como agentes de infecção pode estar diretamente relacionada à produção desses fatores de virulência (hemolisinas, adesinas MR e MS). De fato, Van Den Bosch & col. (23) estudando experimentalmente a virulência de *E. coli* urinárias em camundongos, demonstraram que esta propriedade variava de acordo com os sorogrupo; todas as amostras dos sorogrupo 02, 06 e 018 foram virulentas e a grande maioria das cepas dos sorogrupo 06 e 018ac apresentou hemolisina e MRHA. Esta última característica foi também encontrada em outros sorogrupo. Observando-se a Tabela 1 verificamos que outros sorogrupo apresentaram menor proporção de adesina MR e variação na hemólise.

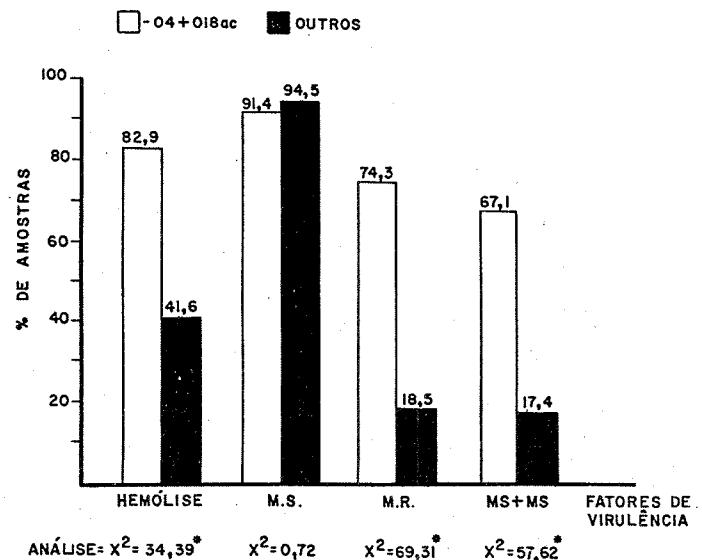
Por outro lado, das 232 amostras que exibiram MSHA (Tabela 2), 126 (54%) foram hemolíticas, não havendo associação significativa entre essas características.

Das 248 amostras analisadas, 85 apresentaram MRHA (+), entre as quais 78 (92%) possuíam as duas adesinas (MR e MS); das 163 amostras MRHA (-), 154 (94,5%) exibiram apenas um tipo de adesina (MSHA). Dos sorogrupo que expressaram ambos os tipos de adesinas (Tabela 1), destacam-se: 018ac - 30 amostras (69,8%), 04 - 17 (63%), 06 - 17 (20,7%), 075 - 5 (19,2%) e 07 - 4 (16,6%), sendo significativa a distribuição dessas adesinas entre os diversos sorogrupo. O encontro dos dois tipos de aglutininas, ao que tudo indica, prevalece como fator importante de virulência, uma vez que, Gander e col. (9), descobriram que amostras de *E. coli* contendo ambas adesinas predominaram nos diferentes quadros clínicos. Além disso, Hagberg & col. (13) demonstraram que amostras de *E. coli* que exibiam somente MRHA ou em combinação com MSHA aderiram em grande número às células epiteliais do trato urinário humano, enquanto que as amostras MSHA ligavam-se em baixo número e as não hemaglutinantes, não se ligavam às células epiteliais do trato urinário.

Tabela 2 - Relação entre produção de hemólise e tipos de hemaglutinização em 248 amostras de *E. coli*.

Hemólise	Tipos de HA	
	MRHA (+)	MSHA (+)
(+)	62 (73)	126 (54)
(-)	23 (27)	106 (46)
Total	85 (100)	232 (100)
Análise	$\chi^2 = 20,18^*$	$\chi^2 = 1,69$

Figura 1 - Distribuição percentual das amostras dos sorogrupo 018ac+04 frente aos demais (outros) de acordo com a hemólise e os tipos de hemaglutinização.



$$\text{ANÁLISE: } \chi^2 = 34,39^*$$

$$\chi^2 = 0,72$$

$$\chi^2 = 69,31^*$$

$$\chi^2 = 57,62^*$$

A Figura 1 ilustra as diferenças fundamentais quanto à produção de hemólise e a distribuição dos tipos de hemaglutinação nos sorogrupo 018ac + 04 frente aos demais. A análise da figura, coloca em evidência que os sorogrupo 018ac + 04 apresentam correlação significativa com a produção de hemólise, a presença de adesinas MR e MR + MS. Esses fatores, segundo Cavaliere (2), podem se encontrar geneticamente ligados, sugerindo que tais determinantes de virulência conferem uma vantagem seletiva para o crescimento e sobrevivência na superfície da mucosa urogenital.

Os resultados obtidos permitem concluir que a patogenicidade de amostras produtoras de infecção urinária devem-se a vários fatores de virulência, como a aderência à células uroepiteliais e a produção de hemolisinas, que neste estudo se encontram associados sobretudo aos sorogrupo 018ac e 04.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Professor Doutor Mário L.C. Ribeiro pela realização da análise estatística e a Doutora Terue Sadatsune pelas sugestões.

Referências Bibliográficas

1. Brooks, H.J.L.; O'Grady, F.; McSherry, M.A. & Cattell, W.R. - Uropathogenic properties of *Escherichia coli* in recurrent urinary-tract infection. *J. Med. Microbiol.*, 13:57-68, 1980.
2. Cavaliere, S.J.; Bonach, G.A. & Snyder, I. - *Escherichia coli* a hemolysin; Characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.*, 48:326-343, 1984.
3. Cooke, E.M. & Ewins, S.P. - Properties of strains of *Escherichia coli* isolated from a variety of sources. *J. Med. Microbiol.*, 8:107-111, 1975.
4. Dugeon, L.S.; Wordley, E. & Bawtree, F. - On *Bacillus coli* infections of the urinary tract, especially in relation to haemolytic organisms. *J. Hyg.*, 20:137-164, 1921.
5. Duguid, J.P. & Gillis, R.R. - Fimbriae and adhesive properties in dysentery bacilli. *J. Pathol. Bacteriol.*, 74:397-411, 1957.
6. Duguid, J.P. & Old, D.C. - Adhesive properties of Enterobacteriaceae. In: Beachey, E.H., ed. *Bacterial adherence. Receptors and recognition*. Series B, vol. 6 London and New York: Chapman and Hall, 185-217, 1980.
7. Evans, G.E. & Evans, D.T. - New surface associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups 06 and 08. *Infect. Immun.*, 21:638-647, 1978.
8. Evans, D.J. Jr.; Evans, D.G.; Hohne, C.; Noble, M.A.; Haldane, E.V.; Lior, H. & Young, L.S. - Hemolysin and K antigens in relation to serotype and hemagglutination type of *Escherichia coli* isolated from extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.*, 13:171-178, 1981.
9. Gander, R.M.; Thomaz, V.L. & Forland, M. - Mannose-resistant hemagglutination and P receptor recognition of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from adult patients. *J. Infect. Dis.*, 151:508-513, 1985.
10. Goodman, L.A. - Simultaneous confidence intervals for multinomial proportions. *Technometrics*, 7:247-254, 1965.
11. Green, C.P. & Thomas, V.L. - Hemagglutination of human type O erythrocytes, hemolysin production, and serogrouping of *Escherichia coli* isolates from patients with acute pyelonephritis, cystitis and, asymptomatic bacteriuria. *Infect. Immun.*, 31:309-315, 1981.
12. Hacker, J.; Huges, C.; Hof, H. & Goebel, W. - Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect. Immun.*, 42:57-63, 1983.
13. Hagberg, L.; Jodal, V.; Korhonen, T.K.; Lindin-Janson, G.; Lindberg, V. & Svanborg Eden, C. - Adhesion, hemagglutination, and virulence of *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Infect. Immun.*, 31:564-570, 1981.

14. Hanley, J.; Salit, I.E. & Hofmann, T. - Immunochemical characterization of P pili from invasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 49:581-586, 1985.
15. Hughes, C.; Phillips, R. & Roberts, P. - Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect. Immun.*, 35:270-275, 1982.
16. Hughes, C.; Hacker, J.; Roberts, A. & Goebel, W. - Hemolysin production as a virulence marker in symptomatic and asymptomatic urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 39:546-551, 1983.
17. Kass, E.H. - Bacteriuria and the diagnosis of infections of the urinary tract. *Arch. intern. Med.*, 100:709-714, 1957.
18. Linghood, M.A. & Ingram, P.L. - The role of alpha haemolysin in the virulence of *Escherichia coli* for mice. *J. Med. Microbiol.*, 15:23-30, 1982.
19. Lyon, M.W. Jr. - A case of cystitis caused by *Bacillus-coli-hemolyticus*. *J. Am. Med. Assoc.*, 69:1342-1343, 1917.
20. Minshew, B.H.; Jorgensen, J.; Swanstrum, M.; Grootes-Reuvecamp, G.A. & Falkow, S. - Some characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from extraintestinal infections of humans. *J. Infect. Dis.*, 137:648-654, 1978.
21. O'Hanley, P.; Low, D.; Romero, I.; Lark, D.; Vosti, K.; Falkow, S. & Schoolnik, G. - Gal-gal binding and hemolysin phenotypes and genotypes associated with uropathogenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.*, 313:414-420, 1985.
22. Vahlne, G. - Serological typing of the colon bacteria. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Suppl.*, 62:1-127, 1945.
23. Van Den Bosch, J.F.; Postma, P.; Koopman, P.A.R.; DeGraaff, J. & McLaren, D.M. - Virulence of urinary and faecal *Escherichia coli* in relation to serotype, haemolysis and haemagglutination. *J. Hyg. Camb.*, 88:567-577, 1982.
24. Watanabe, D.S.A.; Lopes, C.A.M.; Decarlis, R.M.S.T.; Michelin, L. & Montelli, A.C. - Sorogrupos de *Escherichia coli* envolvidos em infecção urinária, em Botucatu, SP. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 16(3):240-244, 1985.

ACTIVIDAD BACTERIOSTATIC DE 2',4'-DIHIDROXI-3'-METOXICHALCONA

Sonia Encarnación Blanco

Juan Kavka

Nora Beatriz Pappano

Nora Beatriz Debattista

Rodolfo Faustino Segovia

& Ferdinando Héctor Ferretti

Escuela de Química

Facultad de Química Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional de San Luis

Chacabuco y Pedernera

5700 San Luis, Argentina

Summary

Bacteriostatic activity of 2',4'-dihydroxy-3'-methoxychalcone

Going on with the performing of microbiological assays with natural substances of unknown properties, the effect exerted by 2',4'-dihydroxy-3'-methoxychalcone (isolated from *Zuccagnia punctata* Cav., San Luis, Argentine), on the growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains, was investigated and quantified. Using a kinetic turbidimetric method, the MIC (58,6 µg/ml) was determined, and the bacteriostatic activity of the compound was interpreted through an inhibition mechanism that implies the complexation of essential metals for the microorganism metabolism.

Resumen

Continuando la realización de ensayos microbiológicos con sustancias naturales de propiedades desconocidas, se investigó y cuantificó el efecto ejercido por 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (aislada de la *Zuccagnia Punctata* Cav., San Luis, Argentina), sobre el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Utilizando un método cinético turbidimétrico se determinó la CMI (58,6 µg/ml) y se interpretó la actividad bacteriostática del compuesto mediante un mecanismo de inhibición que implica la complejación de metales indispensables para el metabolismo del microorganismo.

Introducción

Numerosas flavanonas han sido aisladas de productos naturales obtenidos de la flora regional (5, 8), encontrándose libres como tales o como sus glicósidos. A veces, aparecen junto a 2'-hidroxichalconas con las que están estrechamente relacionadas estructuralmente y como consecuencia de la facilidad con que se interconvierten (2). A partir de la *Zuccagnia punctata* Cav., planta difundida en la región de Cuyo y particularmente en la provincia de San Luis (Argentina), se aislaron dos pares de chalconas-flavanonas isómeras (12). Continuando con experiencias anteriores que implican la realización de ensayos microbiológicos con sustancias naturales cuyas propiedades son desconocidas y la cuantificación de la

possible actividad antimicrobiana de las mismas (9, 11), en este trabajo se investigó el efecto ejercido por uno de esos compuestos naturales, 2',4'-dihidroxi-3'-metoxicalcona, sobre el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Además, utilizando un método cinético turbidimétrico, se determinó la concentración mínima inhibidora para *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923 y se interpretó la potente actividad bacteriostática de la droga mediante un mecanismo de inhibición de tres etapas.

Material y Métodos

Medios de cultivo - agar nutritivo, caldo nutritivo (Oxoid).

Cepas - *S. aureus* ATCC 25923; *E. coli* ATCC 25922.

La estructura y numeración de la sustancia usada se da en la Figura 1. La 2',4'-dihidroxi-3'-metoxicalcona fue obtenida a partir de productos naturales que se encuentran presentes en plantas difundidas en la región de Cuyo y particularmente en la provincia de San Luis (Argentina) (12). También puede ser conseguida por condensación en medio alcalino de benzaldehído y la acetofenona sustituida adecuada (4). La purificación se llevó a cabo por repetidas cristalizaciones desde metanol-agua y por cromatografía en columna de Sephadex LH 20, usando metanol como eluyente; se recuperó la sustancia por evaporación a presión reducida. El control de pureza se efectuó por un lado, por cromatografía de capa fina en placas de poliamida 11 F 254 utilizando metanol-acético-agua (18:1:1) como solvente y por otro, por espectroscopia UV en metanol y etanol.

Preparación del inóculo - a un erlemeyer de 250 ml contenido 30 ml de caldo nutritivo ajustado a pH 7 con buffer PO₄H₂K:PO₄HNa₂, se le transfirió el desarrollo de un tubo de agar inclinado de *S. aureus* de 24h. Se incubó a 33°C con agitación mecánica permanente durante 17h; el desarrollo alcanzado fue de $1,51 \times 10^8$ bact/ml determinado usando el método de enumaración viable.

De forma semejante se preparó el inóculo de *E. coli*. En este caso el desarrollo microbiano que se alcanzó corresponde a una transmitancia aproximada de 0,11 ($4,4 \times 10^9$ bact/ml).

Técnica turbidimétrica empleada - la transmitancia del medio a 720 nm fue utilizada para efectuar las mediciones cinéticas. La concentración celular a diferentes tiempos se obtuvo por medio de la relación

$$\ln N = 27,4 - 10,3 \times T \quad (1)$$

propuesta para *S. aureus* por Pappano y otros (11) y que vincula el número de bacterias viables/ml (N) con las lecturas de transmitancia (T). La ecuación (1) tiene validez para valores de transmitancia mayores que 0,25.

Ensayos cualitativos - cuatro tubos con caldo nutritivo, conteniendo respectivamente 0, 20, 40 y 60 µg de larreína/ml, fueron inoculados con 0,2ml del inóculo de *S. aureus*. Después de 24h de incubación a 37°C se observó el desarrollo microbiano.

Se efectuó una experiencia similar con larreína y *E. coli*.

Ensayos cuantitativos - a 100 ml de caldo nutritivo ajustado a pH 7 con una solución tampón de fosfato, se le adicionaron 114 µl de una solución 0,0163 M de 2',4'-dihidroxi-3'-metoxicalcona en etanol. Se sembró el medio con 2 ml del inóculo de *S. aureus* ($1,51 \times 10^8$ bacterias viables/ml), se distribuyó en 10 tubos provistos de aletas interiores y se incubó a 35,5°C con agitación rotatoria permanente (160 rpm). Después de 1h de incubación y cada 20 min aproximadamente se extrajo un tubo y se midió el desarrollo microbiano por turbidimetría a 720 nm.

Se realizaron experiencias cinéticas similares a la descrita pero con concentraciones de droga en el caldo nutritivo de 15,2; 25,5; 35,7; 45,4; 55,0; 58,6; 65,1 y 75,1 µg/ml. También se efectuó un ensayo análogo en ausencia de

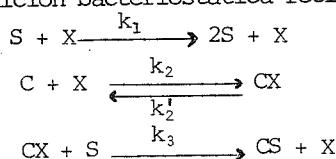
larreina (testigo o control).

Resultados y discusión

Los microorganismos son instrumentos muy convenientes para el examen de las posibles propiedades biológicas de compuestos originales. Los datos de concentración de 2',4'-dihidroxi-3'-metoxicalcona y de turbidez de los ensayos cualitativos realizados se informan en la Tabla 1. Los resultados obtenidos muestran una notable disminución del desarrollo de las bacterias con el agregado de concentraciones crecientes del compuesto natural investigado, siendo más pronunciada la inhibición del crecimiento sobre *S. aureus* que sobre *E. coli*.

La cuantificación de la actividad antimicrobiana de larreina frente a *S. aureus* se hizo necesaria para comparar su actividad en relación a la de un conjunto de chalconas y flavanonas bacteriostáticas ya investigadas (9). Un medio frecuentemente utilizado para medir la inhibición del crecimiento de un microorganismo provocada por una cierta droga consiste en determinar su concentración mínima inhibidora (CMI) empleando la técnica por dilución en tubo (7). Otras veces se cuantifica la acción antimicrobiana de un agente utilizando el método por difusión en agar (3, 13). En el presente trabajo, usando un método cinético turbidimétrico antes descrito (11), se determinó la CMI de 2',4'-dihidroxi-3'-metoxicalcona frente a *S. aureus* ATCC 25923 a partir de datos de velocidades específica de crecimiento (μ_t) y de inhibición ($k_3[X_0]$) de la bacteria y del valor de la constante de estabilidad (K) del quelato metálico (ver ecuación 4). Las cantidades de droga adicionadas a los caldos nutritivos inoculados con *S. aureus* (ensayos cuantitativos), se detallan en la Tabla 2 junto a las respectivas velocidades específicas de crecimiento. La fase exponencial de las curvas de crecimiento bacteriano que se grafican en la Figura 2 muestra efecto bacteriostático máximo del compuesto natural bajo estudio que en concentraciones de $21,7 \times 10^{-5}$ mol/l inhibe totalmente el desarrollo de *S. aureus*.

Las chalconas que como larreina, poseen un oxhidrilo en la posición 2', forman complejos muy estables con iones metálicos bivalentes (6, 14) y trivalentes (1). Esta propiedad permite explicar muy satisfactoriamente los resultados obtenidos para larreina mediante el mecanismo de inhibición bacteriostática recientemente propuesto (9)



y donde S, X y C representan respectivamente al microorganismo, un elemento indispensable para el metabolismo de la bacteria y el compuesto bacteriostático. Este mecanismo de inhibición interpreta la actividad bacteriostática de la droga en función de la complejación de metales indispensables para el metabolismo del microorganismo, considerando también que esos quelatos metálicos (CX) constituyen una forma activa de la droga capaz de atravesar la membrana celular y alterar sus funciones. La dependencia de la velocidad específica de crecimiento (μ) con la concentración de

Tabla 1- Resultados de las pruebas cualitativas, temperatura 37°C, período de incubación 24h, pH 7.

Símbolos: F = concentración de larreina en caldo nutritivo en $\mu\text{g/ml}$.

F	Transmitancia <i>S. aureus</i>	Transmitancia <i>E. coli</i>
0	0,19	0,28
20	0,47	0,43
40	0,70	0,53
60	0,96	0,65

Tabla 2 - Dependencia de la velocidad específica de crecimiento de *S. aureus* con la concentración de larreina (ensayos cuantitativos).

Temperatura 35,5°C

Símbolos: F = concentración de larreina en $\mu\text{g/ml}$; C = concentración de larreina en $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$; μ = velocidad específica de crecimiento en s^{-1}

F	C. 10^5	$\mu \cdot 10^4$
0	0	9,10
5,02	1,85	7,90
15,2	5,62	5,80
25,5	9,44	3,90
35,7	13,2	2,75
45,4	16,8	1,38
55,0	20,4	0,35
58,6	21,7	0
65,1	24,1	0
75,1	27,8	0

Figura 1 - 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona (larreína).

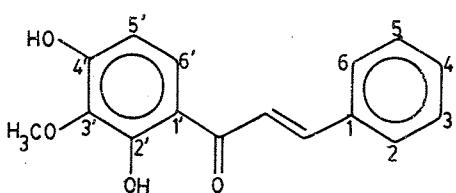


Figura 2 - Efecto cuantitativo de 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona sobre el crecimiento de *S. aureus* a 35,59°C. Concentraciones. 10⁵ en mol.1⁻¹ = (a) 0,00; (b) 1,85; (c) 5,62; (d) 9,44; (e) 13,2; (f) 16,8; (g) 20,4; (h) 21,7 (i) 24,1; (j) 27,8.

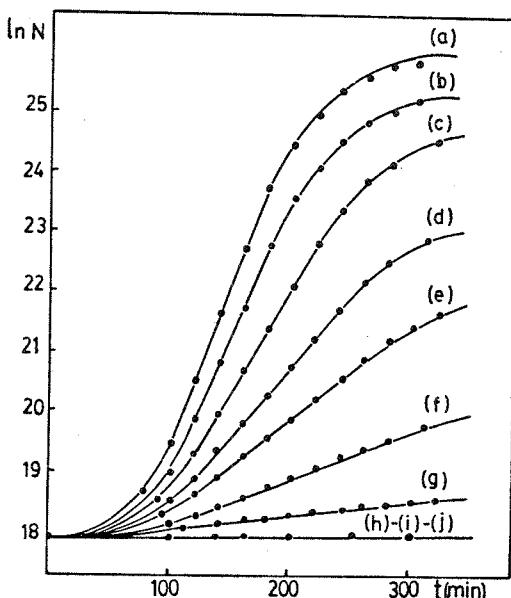
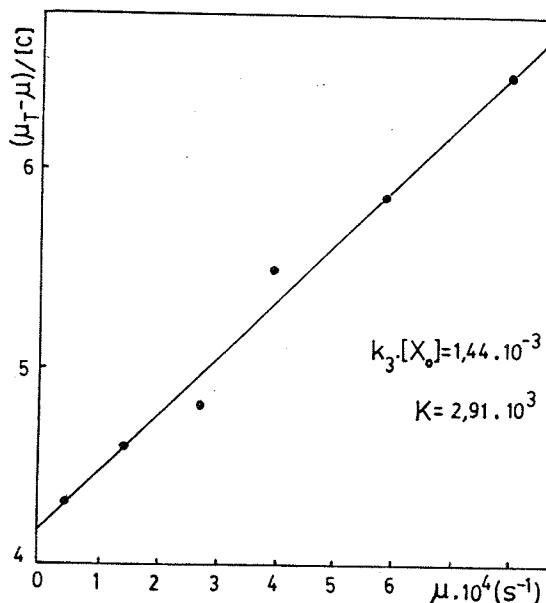


Figura 3 - Constante de estabilidad del complejo CX (K) y velocidad específica de inhibición ($k_3[X_0]$) a 35,59°C para 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona - *S. aureus*.



2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona está dada por la expresión

$$\mu = \frac{\mu_T - k_3 \cdot K[X_0] \cdot [C]}{1 + K \cdot [C]}$$

que se deduce del mecanismo anterior y en la cual, $[C]$: concentración de droga en $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$; μ_T : velocidad específica de crecimiento para $[C]=0$ (testigo o control), en s^{-1} ; $[X_0]$: concentración total del elemento metálico en $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$; K_3 : constante o velocidad de inhibición específica en $\text{ml} \cdot \text{s}^{-1}$ y K : constante de estabilidad del complejo CX. Si se reordena convenientemente la ecuación (2), se obtiene la relación

$$\frac{\mu_T - \mu}{[C]} = k_3 \cdot K \cdot [X_0] + K \cdot \mu$$

Si se representa gráficamente $(\mu_T - \mu)/[C]$ vs μ , mediendo la pendiente de la recta resultante se obtiene el valor de la constante de estabilidad del quelato metálico y de la ordenada al origen se calcula en valor de $K_3 \cdot [X_0]$. Los resultados obtenidos para larreína se muestran en la Figura 3. Por otra parte la concentración mínima inhibidora de la droga se calcula con la expresión

$$\text{CMI} = \frac{\mu_T}{k_3 \cdot [X_0] \cdot K}$$

que se deduce de las ecuaciones (2) ó (3) considerando en ellas $\mu=0$. Así se consigue que CMI (larreína) = $21,7 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Si este resultado se compara con la actividad bacteriostática de *2',4'-dihidroxichalcona* (CMI frente a *S. aureus* a $35,5^\circ\text{C}$ = $11,2 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (10)), cuya estructura química es muy semejante a la *2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcona*, se concluye que la presencia del grupo oximetilo en la posición 3' de larreína desfavorece la potencia bacteriostática de la droga.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con subsidios de la Universidad Nacional de San Luis y CONICET.

Referencias Bibliográficas

1. Debattista, N.B.; Borkowski, E.J.; Pappano, N.B.; Kavka, J. & Ferretti, F.H. - Relaciones estructura-reactividad de chalconas usando métodos de OM simples. An. Asoc. Quím. Argent., 74(2):179-187, 1986.
2. Dhar, D.N. - The chemistry of chalcones and related compounds. New York, John Wiley & Sons, 1981.
3. Gabor, M.; Sallai, J.; Szell, T. & Sipos, G. - Relation of the antibacterial activity and chemical structure of chalcone derivatives. Acta Microbiol. Acad. Sci. hung., 14:45-64, 1967.
4. Geissman, T.A. & Clinton, R.O. - Flavanones and related compounds. I. The preparation of polyhydroxychalcones and flavanones. J. Am. Chem. Soc., 68:697-700, 1946.
5. Guerreiro, R.; Kavka, J. & Giordano, O.S. - Compuestos flavonoides de la *Tessaria dodoneifolia* (Hook. et Arn.) Cabr. An. Asoc. Quím. Argent., 61:161-164, 1973.
6. Jagannatha Swamy, S. & Lingaiah, P. -a) Metal-ligand stability constants of 3-phenyl-1-(2'-hydroxy-5'-chlorophenyl)-2-propen-1-one and 3-(4'-methoxyphenyl)-1-(2'-hydroxyphenyl)-2-propen-1-one with some bivalent metals ions. Inorg. Nucl. Chem. Letters, 14:199-200, 1980. b) Stability constants of La(III), Ce(III), Pr(III), Nd(III), Sm(III), Gd(III) & Dy(III) chelates of substituted 3-phenyl-1-(2'-hydroxyphenyl)-2-propen-1-ones. Indian J. Chem., 19A:495-500, 1980.
7. Joklik, W.K.; Willett, H.P. & Amos, D.B. - Zinsser Microbiología. 17^a ed. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana, 1983.
8. Kavka, J.; Guerreiro, E. & Giordano, O.S. - Flavonoides de la *Tessaria*

- dodoneifolia (Hook. et Arn.) Cabr. Anales Real Soc. Esp. de Fis. y Quím., 73(2):305-306, 1977.
9. Pappano, N.B.; Blanco, S.E.; Debattista, N.B.; Segovia, R.F. & Ferretti, F.H. - Mechanisms of bacteriostatic action of flavonoids on a *Staphylococcus aureus* strain. Com Biol (Bs Aires), 4(1):23-38, 1985.
10. Pappano, N.B.; Blanco, S.E.; Debattista, N.B.; Segovia, R.F. & Ferretti, F.H. - Constants of substituents and relationship structure-activity of chalcones. Com Biol (Bs Aires), 5(1):131, 1986.
11. Pappano, N.B.; Puig de Centorbi, O.; Debattista, N.B.; Calleri de Milan, C.; Borkowski, E.J. & Ferretti, F.H. - Cinética de la acción bacteriostática de chalconas naturales y de síntesis sobre una cepa de *Staphylococcus aureus*. Rev. Arg. Microbiol., 17(1):27-32, 1985.
12. Pederiva, R.; Kavka, J. & D'Arcangelo, A.T. - Chalconas y flavanonas aisladas de *Zuccagnia punctata* Cav. An. Asoc. Quím. Argent., 63:85-90, 1975.
13. Sallai, J.; Gabor, M. & Kallay, F. - Ujabb osszefuggesek nehany kalkon antibakterialis aktivitasa es szerkezete kozott. Acta Pharmaceutica hungarica. 46:49-56, 1976.
14. Syamasundar, K. - Chalcones as inorganic analytical reagents. Proc. Indian Acad. Sci., 2:90-98, 1968.

CIRCULAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM MENORES INSTITUCIONALIZADOS: II - ESTUDO BACTERIOLÓGICO

Maria Diana Lacerda
 Joana D'Arc Cardoso Pontes
 & Ernesto Hofer

Deptº de Bacteriologia
 Instituto Oswaldo Cruz -FIOCRUZ
 Caixa Postal nº 926
 Av. Brasil, nº 4365 - Manguinhos
 21040 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Foram analisadas 83 bactérias isoladas de 151 crianças portadoras de gastroenterite e de 82 adultos assintomáticos e sintomáticos, que prestavam assistência aos referidos menores. *Escherichia coli* enteropatogênica foi o agente prevalente, com 32 isolamentos, representado por 10 sorogrupo. *Escherichia coli* enterotóxica apresentou maior sensibilidade aos 11 antimicrobianos testados, ao contrário de *Shigella* e *Salmonella* que revelaram as mais elevadas taxas de resistência. Dentre as drogas utilizadas, as menos eficazes foram a Sulfatometoxazol - Trimetoprim (SFT), Tetraciclina (Tc) e a Carbenicilina (Cr). Dos 55 perfis de resistência encontrados, 14 foram os mais freqüentes compartilhados por 56% das amostras.

Summary

Circulation flow enteropathogenic bacteria in institutional children: II - Bacteriologic study

Eighty-three strains isolated from 151 children with diarrhea and 82 adults employees of the same institution were studied. The higher frequencies of bacterial isolates were found to classical enteropathogenic *Escherichia coli* of 10 serogroups. Enterotoxigenic *Escherichia coli* was the most susceptible agent to the 11 antimicrobial drugs utilized while the highest rates of resistance were obtained for *Shigella* and *Salmonella*. All pathogens isolated tended to be more resistant to Trimethoprin-Sulphamethoxazole (SFT), Tetracycline (Tc) and Carbenicilin (Cr). A variety of 55 different resistance patterns were identified with 14 predominating in 56% of the samples.

Introdução

A família Enterobacteriaceae engloba agentes patogênicos responsáveis por processos entéricos no homem e outros, caracterizados como oportunistas, cuja ação se manifesta apenas em situações ocasionais. No primeiro grupo estão incluídas as bactérias dos gêneros *Shigella* e *Salmonella*, reconhecidas classicamente pela capacidade agressora em todos os seus membros (5,12) e a *Escherichia coli* enteropatogênica-EPEC cuja significação etiopatogênica em alguns sorogrupo permanece ainda questionável (4,11,16). A importância destes últimos, carece de maiores investigações, uma vez que freqüentemente são incriminados como causadores

de diarréia esporádica em países em desenvolvimento (4,13,26).

Nestas duas últimas décadas, com a identificação de novos patógenos infecciosos, é possível se estabelecer a etiologia de 60 a 70% dos processos entéricos humanos. Paralelamente, emergiu um amplo debate relacionado ao mecanismo de patogenicidade e fatores correlatos.

Em estudo prévio (Manuscrito em preparação I), descrevemos a circulação de múltiplos enteropatógenos bacterianos em instituição para atendimento de menores, na cidade do Rio de Janeiro, RJ, caracterizando o papel desempenhado pelas crianças diarréicas e funcionários assintomáticos na veiculação destas bactérias. A presente investigação é uma complementação da primeira, propondo-se estudar as enterobactérias isoladas, identificando os possíveis fatores de virulência e marcos de resistência a diferentes antimicrobianos.

Material e Métodos

Amostragem - Foi analisado um total de 83 amostras bacterianas das quais 59 obtidas de coproculturas realizadas em 151 crianças com distúrbios entéricos (grupos A e B) e 24 oriundas de 82 funcionários (grupo C), que prestavam assistência aos referidos infantes. Neste último grupo estavam incluídas 16 amostras de indivíduos assintomáticos e de 8 diarréicos. O grupo "A" era integrado por menores recém admitidos e o grupo "B" por aqueles que já estavam internados ao se iniciar o estudo.

Ensaio Bacteriológicos - O material fecal colhido através de zaragatoa e conservado em meio de Stuart, era enviado imediatamente ao laboratório para processamento. Neste caso adotou-se o esquema clássico de isolamento e identificação de enterobactérias, utilizando-se dois meios de enriquecimento (Caldo Tetratrationato de Kauffmann - Difco e Rappaport modificado por Hofer) e três meios seletivos-indicadores (Agar eosina azul de metíleno, EMB - Difco; Agar SS - Difco e Hektoen Enteric Agar-Merck). As colônias fermentadoras e não fermentadoras de lactose e sacarose, eram submetidas à caracterização bioquímica, de acordo com as recomendações de Edwards & Ewing (5). Em seqüência foram determinados os sorogrupos e sorotipos de *Salmonella*, *Shigella* e *E. coli* (enteropatogênicas e invasoras) mediante testes de aglutinação rápida com antissoros polivalentes e seus respectivos constituintes monoespecíficos, somáticos, de envoltórios e flagelares (Laboratório de Enterobactérias I.O.C. e Bio-Manguinhos-FIOCRUZ). A pesquisa de *Campylobacter* foi realizada segundo o esquema proposto por Skirrow, 1977 (23) e Smibert - 1978 (24). Sumariamente, o espécime clínico era inoculado em meio seletivo de agar sangue adicionado de Polimixina "B" - (2,5 µg/ml), Vancomicina (10 µg/ml) e Trimetoprim (5 µg/ml). Incubado em garrafas Gaspack, de modo a obter um sistema de microaerofilia, por 24 a 48 h a 42°C. As colônias puntiformes e brilhantes eram submetidas à coloração pelo método de Gram. Posteriormente, as amostras isoladas eram classificadas como *Campylobacter* sp. segundo os critérios de ausência de crescimento a 25°C, sensibilidade ao ácido nalidíxico (300 µg/ml) e presença de catalase.

Adesividade e Enterotoxigenicidade - Nas cepas de *Escherichia coli* analisou-se ainda a capacidade de adesão e toxigenicidade. Os fatores de colonização FC I e FC II foram pesquisados por meio de prova de hemaglutinação em placa de vidro, tipo Kline, utilizando-se hemácias humanas e de bovinos, na presença e ausência de D-manoze (6,7). A enterotoxina termolábil-IT foi determinada pela técnica de imuno-hemólise passiva-PIH, modificada por Castro & col. (2) e a enterotoxina termoestável-ST, por inoculação intra-gástrica em camundongos recém-nascidos de 3 a 5 dias de idade (3).

Invasibilidade - A pesquisa de colibacilos invasores teve como critério primário a imobilidade e ausência de descarboxilação da lisina (27). Independente dos resultados da análise sorológico, as amostras eram testadas quanto à capacidade de produzir o quadro de ceratoconjuntivite em cobaios-Teste de Serény (22).

Suscetibilidade a Antimicrobianos - Foram realizados pela técnica de difusão em agar (1), empregando-se discos de fabricação Cecon representados pelos seguintes antimicrobianos: Ampicilina (Ap) - 10 µg, Carbenicilina (Cr) - 100 µg, Cefoxitina (Ct) e Cloranfenicol (Co) - 30 µg, Fosfomicina (Fo) - 50 µg, Gentamicina (Gn) - 10 µg, Canamicina (Kn) - 30 µg, Sisomicina (Ss) e Colistina (Cl) - 10 µg, Sulfametoxazol-trimetoprim (SFT) - 25 µg e Tetraciclina (Tc) - 30 µg.

Resultados

Os espécimes fecais analisados propiciaram a detecção de 83 bactérias enteropatogênicas, (Tabela 1), segundo a natureza do grupo (infantil ou adulto). *Escherichia coli* enteropatogênica foi o agente com maior número de isolamentos, distribuídos em 10 sorogrupos, oriundos de casos diarréicos infantis, enquanto nos adultos foram caracterizados 6 tipos sorológicos.

No confronto entre estes dois grupos denota-se que apenas EPEC apresentou um certo equilíbrio entre as frequências, 14,5 e 12,2%; quanto à ETEC, *Salmonella* e *Shigella* houve predominância nos menores e o *Campylobacter* sp. nas coproculturas de adultos. Salienta-se o encontro de três fenotipos enterotóxicos de *Escherichia coli* com uma freqüência maior para as amostras produtoras de LT, nos indivíduos diarréicos.

A Tabela 2 mostra a distribuição de resistência exibida pelas enterobactérias isoladas frente aos 11 antimicrobianos utilizados. As maiores taxas de resistência foram expressas para SFT, Tc e Cr.

A Tabela 3 retrata especificamente a resistência de cada agente bacteriano. Verifica-se que ETEC foi mais sensível e *Shigella* a mais resistente aos fármacos testados.

Agrupando-se as cepas por número de marcos de resistência (Tabela 4), evidencia-se que apenas 5,6% foram totalmente sensíveis a uma ou mais drogas. Dentro as resistentes, 54,9% apresentaram multirresistência.

Finalmente, cumpre assinalar que dos 55 perfis de resistência identificados, selecionou-se os 14 mais frequentes compartilhados por bactérias do mesmo gênero ou não (Tabela 5).

Tabela 1 - Bactérias enteropatogênicas isoladas de 151 crianças institucionalizadas e 82 funcionários adultos. (1982 - 1983).

Símbolos: * adulto com distúrbio entérico, ** 2 adultos com distúrbio entérico.

Enteropatogênicos	Grupos			Total	%
	Infantil Nº	Adulto Nº	%		
EPEC:					
055	4	3		7	
0111	3	2		5	
026	4	1*		5	
0119	4	-		4	
0125	2	-		2	
0126	1	-		1	
0128	1	1		2	
025	1	2**		3	
018	1	1		2	
091	1	-		1	
Sub-total	22	14,5	10	12,2	32 13,7
EIEC:					
0143	-	1		1	
ETEC:					
LT+	8	1		9	
ST+	5	2		7	
LT+/ST+	2	-		2	
Sub-total	15	9,9	3	3,7	18 5,4
<i>Shigella</i> :					
<i>S. flexneri</i>	7	-		7	
<i>S. sonnei</i>	3	1*		4	
<i>S. boydii</i>	1	-		1	
Sub-total	11	7,3	1	1,2	12 5,1
<i>Salmonella</i> :					
<i>S. typhimurium</i>	6	1*		7	
<i>S. lomita</i>	1	-		1	
Sub-total	7	3,9	1	1,2	8 3,4
<i>Campylobacter</i> sp.	4	2,7	8**	9,7	12 5,1
Total	59	39,0	24	29,3	83 35,6

Discussão

O presente estudo demonstrou que os sorogrupos de EPEC mais prevalentes (055, 0111, 026 e 0119) correspondem àqueles comumente relacionados aos quadros diarréicos e de maior ocorrência em várias partes do Brasil (17, 18, 26) e em diferentes países, como Índia (21), Chile (10), Etiópia (25) e Bangladesh (13).

É provável que o amplo espectro de sorogrupos, em número de 10, em um grupo populacional oriundo de áreas periféricas da cidade, reflita a abrangência dos sorogrupos incidentes na população do Rio de Janeiro. Esta hipótese respalda-se no fato de que a alta rotatividade com que opera a instituição aliada à intensidade de contatos, favorece a manutenção e renovação sistematicamente contínua da flora microbiana carreada pelos menores.

Tabela 2 - Distribuição numérica e percentual de resistência expressa por enterobactérias isoladas nos grupos infantis (A e B) e grupo de adultos (C).

Símbolos: () percentagem.

Grupos	Nº de Amostras	Determinantes de resistência										
		Ap	Cr	Ct	Oo	Fo	Gn	Kn	Ss	SFT	Tc	C1
A	34	21 (61,8)	25 (73,5)	1 (2,9)	10 (29,4)	11 (32,4)	4 (11,4)	10 (29,4)	7 (20,6)	25 (73,5)	22 (64,7)	16 (47,0)
B	21	6 (28,6)	8 (38,1)	5 (23,8)	5 (23,8)	4 (19,0)	1 (4,7)	5 (23,8)	5 (23,8)	11 (52,3)	12 (57,0)	11 (52,3)
C	16	4 (25,0)	11 (68,7)	7 (43,7)	6 (37,5)	5 (31,0)	1 (6,2)	5 (31,0)	1 (6,2)	12 (75,0)	10 (62,5)	5 (31,0)
Total	71	31 (43,6)	44 (62,0)	13 (18,3)	21 (29,6)	20 (28,2)	6 (8,4)	20 (28,2)	13 (18,3)	48 (67,6)	44 (62,0)	32 (45,0)

Tabela 3 - Percentagem de resistência a antimicrobianos nas enterobactérias isoladas.

Símbolos: EIEC - com 1 único isolamento, foi sensível apenas a CL.

Agente	Nº de Amostras	Antimicrobianos										
		Ap	Cr	Ct	Oo	Fo	Gn	Kn	Ss	SFT	Tc	C1
EPEC	32	37,5	62,5	28,1	31,2	25,0	0	31,2	15,6	71,9	78,1	40,6
EIEC	18	11,1	50,0	0	0	27,8	0	0	11,1	38,9	11,1	77,8
Shigella	12	83,3	83,3	16,7	58,3	33,3	16,7	41,7	16,7	91,7	83,3	16,0
Salmonella	8	75,0	50,0	12,5	37,5	25,0	37,5	50,0	37,5	75,0	75,0	37,5

Ainda que o significado real das cepas de EPEC em casos esporádicos de diarréia seja controvertido (4, 11, 16), não se pode deixar de valorizar o encontro de três funcionários com manifestação entérica, eliminando um único agente representado por *Escherichia coli* 026 e 025. Estes achados sugerem que estas bactérias foram as causadoras das síndromes diarréicas e nos permite questionar o papel que estes indivíduos podem representar em centros institucionais similares, constituindo também um fator de risco para a comunidade, tendo em vista as condições sócio-culturais desta categoria de pessoal. Tanto os doentes como os portadores saudáveis cursaram, quando muito, o primeiro segmento do primeiro grau e tiveram algum treinamento prático.

Uma outra questão que requer uma análise mais minuciosa refere-se ao fenótipo toxigenico de *Escherichia coli* produtor de LT, cuja patogenicidade é controvertida. Por sinal nesta pesquisa foi o fenótipo mais frequente (9/18), entretanto nas oito amostras isoladas de infantes diarréicos, nenhum apresentava fator de colonização (FC), indicado pela técnica de hemaglutinação em lâmina. Alguns autores como Trabulsi (27) e Reis & col. (19) advogam que fenótipos de LT⁺ apenas, seriam destituídos de fatores de colonização e incidiriam indistintamente em saudáveis e doentes. Por outro lado, existem trabalhos que taxativamente associam este fenótipo à doença diarréica, tanto em adultos como em crianças (9, 29). Também não se detectou fatores de colonização nas amostras produtoras de LT⁺ST⁺, somente uma ST⁺ possuía o FC II. Não se pode afirmar

Tabela 4 - Percentual de sensibilidade e resistência múltipla nas enterobactérias isoladas dos diferentes grupos.

Grupos	Marcos de resistência				
	Nº	0	1	3	4
A	34	5,8	26,5	67,6	
B	21	9,5	52,3	38,1	
C	16	-	50,0	50,0	

Tabela 5 - Distribuição dos perfis de resistência mais frequentes nas enterobactérias isoladas, nos diferentes grupos populacionais.

Modelos	Agentes Isolados	Grupos
Sensível	EPEC - LT ⁺ EPEC - ST ⁺ EPEC - 0119 Salmonella	A B B
Tc	EPEC - 055 EPEC - 0119 EPEC - 026	A B B
Cl	EPEC - ST ⁺ EPEC - ST ⁺ LT ⁺ EPEC - 025 026	A B B AA
Cr-SFT	EPEC - LT ⁺ EPEC - 0125 ETEC - LT ⁺ ETEC - ST ⁺	C A B A B
SFT-Tc	EPEC - 025 EPEC - 055	C C
Cl-Fo	ETEC - LT ⁺ ETEC - ST ⁺	BB B
Ap-SFT-Tc	Salmonella EPEC - 025 EPEC - 055	AA C C
Cr-Cl-Tc	ETEC - LT ⁺ ETEC - LT ⁺ ST ⁺	BB B
Ap-Cr-SFT-Tc	Shigella EPEC - 055	A BB
Ap-Cr-SFT-C1	Shigella EPEC - 018	A A
Ap-Cr-SFT-Tc-C1	EPEC - 0119	AA
Ap-Cr-Tc-Cl-Kn	Shigella	AA
Ap-Cr-Oo-SFT-Tc-Cl	Shigella	AA
Ap-Cr-Oo-SFT-Tc-Cl-Gn	Shigella	A
Ap-Cr-Oo-SFT-Tc-Cl-Ss-Fo-Gn	EPEC - 091 Salmonella EPEC - 0111	A A A

se esta adesina foi perdida ou se tal ausência estaria relacionada ao sorogrupo, pois as cepas ficaram algum tempo estocadas e não pudemos efetuar a análise sorológico.

Devido à dificuldade de manutenção no laboratório das amostras isoladas de *Campylobacter* sp., os resultados se limitaram a fase inicial de caracterização do gênero.

Quanto à ocorrência de membros dos gêneros *Shigella* e *Salmonella*, é importante destacar dois aspectos: 1- a ausência de portadores no grupo de adultos e 2- foram as cepas que registraram maior resistência aos antimicrobianos, principalmente àqueles que constituem drogas eletivas no tratamento de síndrome entérica (Ap, Tc e SFT). É admissível supor que tais agentes tenham sido outrora, os mais prevalentes naquele ecossistema, considerando que as cepas multirresistentes, em geral, são aquelas que suportam a ação seletiva de drogas antimicrobianas, particularmente as de uso mais difundido (28).

Com relação à ETEC, o patógeno mais sensível neste estudo, os resultados foram similares aos encontrados por Sack & col. (20) e Murray (14). Aliás, foi sugerido (15) que plasmídios, carreados por ETEC podem através de processo de incompatibilidade, bloquear o estabelecimento de fatores de resistência.

Relevante também é o fato de que amostras originárias de crianças do grupo "A" (recentemente admitidas) apresentaram multirresistência mais elevada do que as do grupo "B" (Tabela 5). Estas crianças eram encaminhadas ao Centro, quase sempre com processos infecciosos diversos, sendo então submetidas à antibioticoterapia e a constantes internações. Como a colheita era feita, muitas vezes, na intercorrência desses episódios, é possível que as cepas multirresistentes, tenham tido origem nosocomial.

A seleção dos perfis de resistência mais freqüentes (Tabela 5) compartilhados por 40 das 71 culturas analisadas, permitiu visualizar melhor a multirresistência das cepas do grupo "A" e a monoresistência do grupo "B". Observa-se ainda certas particularidades nestes 14 modelos: a resistência à Ap surge oito vezes e à Cl em nove vezes, chamando-se atenção para o fato de que Cl, apesar de ter sido introduzido durante o estudo em substituição à SFT, apresentou altos percentuais de resistência como aquele configurado para ETEC (Tabela 3).

Admite-se que a origem da resistência múltipla, observada nas amostras tenha sido mediada por plasmídios e que os diferentes marcadores poderiam ter ocorrido simultaneamente. Assim, um único antimicrobiano exerceria pressão seletiva, determinando a emergência e colonização de cepas multirresistentes (8, 17, 28).

O controle de enteroinfecções bacterianas em instituições como a considerada neste estudo, encontra-se comprometido pelo discreto conhecimento sobre o papel e a distribuição de patógenos, como EPEC e ETEC, em nosso meio. Assim, a freqüência de isolamento obtida para estas duas bactérias e a reconhecida capacidade de aquisição de plasmídios R permite-nos enfatizar a necessidade de uma reavaliação contínua sobre os agentes bacterianos que circulam em sistemas assistenciais que congregam suscetíveis.

Referências Bibliográficas

1. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Amer. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1986.
2. Castro, A.F.P.; Serafim, M.B.; Gomes, J.A. & Gatti, M.S.V. - Improvements in the passive immune hemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., - 12:714-717, 1980.
3. Dean, A.G.; Ching, Y.; William, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in a study of children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1972.
4. Edelman, R. & Levin, M.M. - Workshop on enteropathogenic *E. coli*. J. Infect. Dis., 147:1108-1118, 1983.
5. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3. ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1972.
6. Evans, D.G. & Evans, D.J.Jr. - New surface associated heat labile colonization factor antigen (CFA/II) produced by enterotoxigenic *Escherichia coli* of serogroups O6 and O8. Infect Immun. 21:638-647, 1978.

7. Evans, D.G. & Evans, D.J.Jr. & Tjoa, W. - Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* associated from adults with diarrhea: Correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, 18:330-337, 1977.
8. Fisher, G.M.; Kelsey, M.C. & Cooke, E.M. - An investigation of the spread of gentamicin resistance in a district general hospital. *J. Med. Microbiol.*, 22:69-77, 1966.
9. Gorbach, S.L.; Kean, B.H.; Evans, D.G.; Evans, D.J.Jr. & Bessudo, D. - Traveler's diarrhea and toxigenic *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.*, 292:933-936, 1975.
10. Gronemeyer, R.M.G.F. - Estudio de prevalencia de serotipos enteropatógenos de *Escherichia coli* en deposiciones de niños que habitan una población suburbana de Santiago. *Rev. Clin. Pediatr.*, 51:225-227, 1980.
11. Gross, R.J. & Rowe, B. - *Escherichia coli* diarrhea. *J. Hyg Camb.*, 95:531-550, 1985.
12. Kauffmann, F. - The bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, 1966.
13. Moyenuddin, M. & Rahman, K.M. - Enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhea in hospitalized children in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, 22:838-840, 1985.
14. Murray, B.E. - Resistance of *Shigella*, *Salmonella* and other selected enteric pathogens to antimicrobial agents. *Rev. Infect. Dis.*, 8:S 172-181, 1986.
15. Orskov, F.; Orskov, I.; Evans, D.J.Jr.; Sack, D.A. & Wadstrom, T. Special *Escherichia coli* serotypes among enterotoxigenic strains from diarrhea in adults and children. *Med. Microbiol. Immunol.* 162:73-80, 1976.
16. Orskov, I.; Orskov, F. & Jann, K. - Serology, chemistry and genetics of "O" and "K" antigens of *Escherichia coli*. *Bact. Rev.*, 41:667-710, 1977.
17. Pessôa, G.V.A.; Suguimori, R.T.; Irino, K.; Raskin, M. & Calzada, C.T. - Isolamento de enterobactérias patogênicas em berçários do município de São Paulo. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 40:107-127, 1980.
18. Queiroz, D.M.M.; Mendes, E.N.; Cisalpino, E.O.; Peres, J.N. & Penna, F.J. - Frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica em crianças com diarréia aguda e em controles, em Belo Horizonte. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 16:95-100, 1985.
19. Reis, M.H.L.; Guth, B.E.; Gomes, T.A.T.; Murahovschi, J. & Trabulsi, L.R. - Frequency of *Escherichia coli* strains producing heat-labile toxin a heat-stable toxin or both in children with and without diarrhea in São Paulo. *J. Clin. Microbiol.*, 15:1062-1064, 1982.
20. Sack, D.A.; Kaminsky, D.C.; Sack, R.B.; Itotia, J.N.; Arthur, R.R.; Kapikian, A.Z. & Orskov, F. - Prophylactic doxycycline for travellers diarrhea. Results of a prospective double-blind study of peace corps volunteers in Kenya. *M. Engl. J. Med.*, 298:758-763, 1978.
21. Sen, D.M.R.; Saba, S.K.; Niyogi, G.B.; Nair, S.P.; Datta, S.C.; Pal, R.B. & Roychowdhury, J. - Aetiological studies on hospital in patients with acute diarrhea in Calcutta. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 77:212-214, 1983.
22. Serény, B. - Experimental *Shigella* keratoconjuntivitis: a preliminary report. *Acta. Microbiol. Acad. Hung.*, 2:293-296, 1955.
23. Skirrow, M.B. - *Campylobacter enteritis*: a "new disease". *Brit. Med. J.*, 2:9-11, 1977.
24. Smibert, R.M. - The genus *Campylobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 32:673-709, 1978.
25. Thorén, A. - The role enteropathogenic *Escherichia coli* in infantile diarrhea. *Infect. Dis.*, 37(Suppl.37):1-15, 1983.
26. Toledo, M.R.; Alvariza, M.C.B.; Murahovschi, J.; Ramos, R.T.S. & Trabulsi, L.R. - Enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes and endemic in infantis. *Infect. Immun.*, 39:586-589, 1983.
27. Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. 1.ed., p.135, Atheneu, Rio de Janeiro, 1981.
28. W.H.O. - Scientific working group - Antimicrobial resistance. *Bul. W.H.O.*, 61:383-394, 1983.
29. Wood, L.V.; Wolfe, W.H.; Ruiz-Palacios, G.; Foshee, W.S.; Corman, L.I.; McCleskey, F.; Wright, J.A. & DuPont, H.L. - An outbreak of gastroenteritis due to a heat-labile enterotoxin producing strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 41:931-934, 1983.

RESISTANCE TO AMIKACIN AND SISOMICIN IN GRAM-NEGATIVE BACILLI AND STAPHYLOCOCCI

Laurinda A. Soares

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

Summary

The gradient plate technique (Szybalski's method) was used to obtain 500 mutants of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* indol-positive and *P. indol-negative*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*. Amikacin and sisomicin were used as selective agents. Resistant mutants had factors of fold-increase that varied from 4 to 32 times, as compared to the wild-type strains. There was loss of resistance to sisomicin in 38.4% of the clones and to amikacin in 18.0% on storage of the cells at room temperature. The genetic basis of the acquired antibiotic resistance was not determined, yet some considerations about the mechanisms possibly involved are pointed out.

Resumo

Resistência a amicacina e sisomicina em bacilos Gram-negativos e estafilococos

A técnica de gradiente (método de Szybalski) foi utilizada para obter 500 mutantes de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* indol-positivo e *P. indol-negativo*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Como seletores de resistência foram usadas amicacina e sisomicina. As mutantes resistentes apresentaram fatores de aumento de resistência que variaram de 4 a 32 vezes, comparadas com os tipos selvagens. Houve perda de resistência adquirida para sisomicina em 38,4% dos clones, e para amicacina em 18,0% com estocagem das células em temperatura ambiente. A base genética da resistência adquirida não foi determinada; contudo são tecidas algumas considerações sobre mecanismos possivelmente envolvidos.

Introduction

Since the discovery of the sulfonamides, it has been demonstrated that bacteria show the singular capacity to acquire defense mechanisms to antimicrobial drugs (6, 15, 16). The emergence of novel bacterial strains which develop resistance to the aminoglycoside antibiotics poses a serious problem into the clinic. Opportunist pathogens such as *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella*, *E. coli* etc are particularly important in hospital infections. In all instances, the acquisition of resistance results from antibiotic pressures to which the bacterium is exposed. Such resistance arise as a result of plasmid transfer, which confers resistance to the receptor cells, or as a result of mutations in chromosomal genes encoding the target site or affecting access to that site. The mechanism of action of the aminoglycosides is the inhibition of protein synthesis: the primary target of

streptomycin, the most investigated of the group, is the 30S subunit of the bacterial ribosome, thus hindering its binding to messenger RNA. The mechanism of resistance to aminoglycosides has been extensively studied. This resistance may be determined by several biochemical mechanisms, which include: alteration of the antibacterial target site to make the drug effect less severe; interference with antibiotic transport into the cell by reduced uptake; and antibiotic inactivation by bacterial enzymes (3,4). The resistance can either be expressed constitutively or be inducible. It is characteristic of induced resistant bacteria their inability to concentrate antibiotic. Such mutations involve lesions in carrier proteins, porins or membrane products, which affect antibiotic accumulation inside the cell (2, 7, 12, 14, 19).

The main purpose of this study was to verify the effect of amikacin and sisomicin as selectors of resistance to the aminoglycoside antibiotics in Gram-negative bacilli and staphylococci, notoriously hospital infection agents.

Material and methods

Bacterial strains - The strains used in this study were isolated from clinical specimens (urinary tract infections, burned patients, wounds, septicemia etc) from 1975 to 1979 from different hospitals. It was somehow difficult to select, among more than 2000 isolates, bacterial strains susceptible concomitantly to sisomicin and amikacin, since in general strains with low MICs for sisomicin have high MICs for amikacin, and vice-versa (unpublished data). Ten strains of each *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* indol-positive and *P.* indol-negative, *E. coli*, and *Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis* were used.

Antimicrobial agents - The drugs were kindly supplied by Bayer AG (sisomicin) and Bristol Laboratories (amikacin).

Gradient plate method - A Petri dish with two layers of agar was employed. The lower layer consisted of 15ml of Mueller-Hinton agar, slanted just sufficiently to cover the bottom. Another 15ml of Mueller-Hinton agar, containing known amounts of the desired antibiotic, was added over the solidified agar. The concentration of antibiotic in the upper layer was 3 to 12 times higher than the MIC of each wild organism. An overnight broth culture was spread over the agar surface. From those colonies developed in the highest antibiotic concentration region, five colonies from each microorganism plated on sisomicin and amikacin were transferred to BHI agar without drugs, randomly collected, and maintained at room temperature (18).

Susceptibility tests - The minimum inhibitory concentrations (MIC) of sisomicin and amikacin for the wild types and their mutants were carried out using the Steers' replicator, according to method described elsewhere (17).

Results

Using sisomicin and amikacin as selective agents, 500 resistant strains of *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* sp and *Staphylococcus* sp were isolated. The minimum inhibitory concentrations of their wild types are listed in Table 1. All strains were susceptible to both sisomicin and amikacin concomitantly, MICs varying from 0.125mcg/ml to 8mcg/ml.

Table 2 shows the factors of increasing resistance (fold increase) as compared to the respective wild types. A greater number of resistant strains with higher levels of resistance to amikacin was observed. Out of the 50 bacterial strains selected by each drug for each genus, 100% of the strains of *E. coli* and *Proteus* where resistant to amikacin. Considering all the 250 clones selected by each drug, 61.6% became resistant to sisomicin and 82% became resistant to amikacin.

Fig. 1 shows the susceptibility of the wild types and their mutants to sisomicin and amikacin. Strains isolated from plates containing sisomicin were considered

homologous mutants for sisomicin and heterologous mutants for amikacin; and strains isolated from plates containing amikacin were considered homologous mutants for amikacin and heterologous mutants for sisomicin. The parameter for a strain to be considered as resistant was a MIC value of $\geq 4\text{mcg/ml}$ for sisomicin and $\geq 32\text{mcg/ml}$ for amikacin, since the clinically achievable serum concentration for both drugs are respectively $> 4\text{-}6\text{mcg/ml}$ and $> 26\text{mcg/ml}$, with the recommended unit dose (5). Clones selected by amikacin were susceptible to sisomicin in 100% of *Staphylococcus*, 92% of *Klebsiella*, 98% of *E. coli*, 28% of *Proteus* and 42% of *Pseudomonas*; and the same clones were susceptible to amikacin in 86% of *Staphylococcus*, 84% of *Klebsiella*, 44% of *E. coli*, 18% of *Proteus* and 60% of *Pseudomonas*. Clones selected by sisomicin were susceptible to sisomicin in 90% of *Staphylococcus*, 84% of *Klebsiella*, 78% of *E. coli*, 32% of *Proteus* and 38% of *Pseudomonas*; and the same bacteria were susceptible to amikacin in 70% of *Staphylococcus*, 84% of *Klebsiella*, 46% of *E. coli*, 16% of *Proteus* and 80% of *Pseudomonas*. It appears that *Proteus* and *Pseudomonas* are more likely to become resistant to sisomicin, while *E. coli* and *Proteus* are more likely to acquire resistance to amikacin.

Discussion

In many clinical bacterial isolates the gene which confers resistance to some antibiotics is not expressed until the cell is in the presence of subinhibitory concentrations of the drug. The bacterium "recognizes" inducing concentrations of the drugs and processes the information in a way to make the daughter cell population phenotypically resistant. Greater concentrations of antibiotic block induction due to inhibition of protein synthesis. The gradient-plate method here employed offers such conditions "in

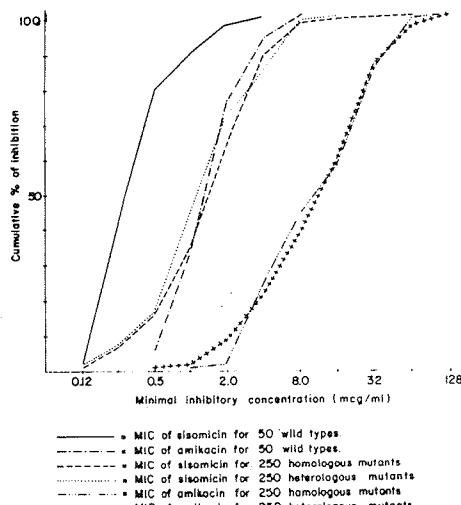
Table 1 - Minimum inhibitory concentrations of sisomicin and amikacin for 50 wild-type strains.

Isolates (number)	Antibiotics	MIC - mcg/ml						
		0.125	0.25	0.5	1.0	2.0	4.0	8.0
<i>Klebsiella</i> (10)	Sisomicin	-	3	6	1	-	-	-
	Amikacin	-	-	-	3	5	2	-
<i>Staphylococcus</i> (10)	Sisomicin	1	8	1	-	-	-	-
	Amikacin	-	-	3	4	1	2	-
<i>Pseudomonas</i> (10)	Sisomicin	-	1	1	3	5	-	-
	Amikacin	-	-	-	1	3	4	2
<i>E. coli</i> (10)	Sisomicin	-	3	7	-	-	-	-
	Amikacin	-	-	-	2	8	-	-
<i>Proteus</i> (10)	Sisomicin	-	6	3	1	-	-	-
	Amikacin	-	-	-	4	4	2	-
Total (50)	Sisomicin	1	21	18	5	5	-	-
	Amikacin	-	-	3	14	21	10	2

Table 2 - Increasing resistance of the minimum inhibitory concentrations of all mutants as regard to the selective agent. Symbols: S = number of strains which exhibited the signalized fold increase for each drug.

Microorganism (number)	Selective agent	Factor of resistance (fold increase)				Total no./%
		4x	8x	16x	$>32x$	
<i>Klebsiella</i> (50)	Sisomicin	S 18	5	2	-	25 / 50%
	Amikacin	15	9	3	-	27 / 54%
<i>Staphylococcus</i> (50)	Sisomicin	11	10	5	-	26 / 52%
	Amikacin	13	16	6	9	44 / 88%
<i>Pseudomonas</i> (50)	Sisomicin	18	3	-	-	21 / 42%
	Amikacin	21	9	4	-	34 / 68%
<i>E. coli</i> (50)	Sisomicin	26	12	2	1	41 / 82%
	Amikacin	11	4	29	6	50 / 100%
<i>Proteus</i> (50)	Sisomicin	-	8	19	14	41 / 82%
	Amikacin	2	6	12	30	50 / 100%
Total (250)	Sisomicin	73	38	28	15	154 / 61.6%
	Amikacin	62	44	54	45	205 / 82%

Figure 1 - Susceptibility of the wild types and their respective mutants to sisomicin and amikacin.



"vitro". A great number of resistant bacteria was selected by amikacin and sisomicin after a single exposure to the drugs. There was an expressive difference among the MIC values of both drugs for the selected strains. Among the clones selected at the highest antibiotic concentration there were small colonies and colonies of the normal size. Saunders (16) reports gentamicin-resistant, small colony variants of *S. aureus* that grew more slowly, and hence showed reduced invasiveness than wild-type strains. However, a number of bacterial strains with chromosomal mutations has been described with increased resistance without reduction in their capacity to survive, as in clinical isolates of gonococci (13).

There was loss of resistance to sisomicin in 38.4% of the strains and to amikacin in 18.0% on storage of the cells at room temperature. Lacey (9) found that *S. aureus* resistance to erythromycin was unstable "in vitro" due to the loss of chromosomal genes coding for resistance. Loss of resistance was found in 27.6% of the cells. This could be explained as excision of the transposon from the chromosome. Such instability has also been found in plasmid mediated resistance.

There are a number of reports which describe the mechanisms of aminoglycoside resistance in clinical isolates. Hull et al (8) isolated spontaneous mutants of *E. coli* K12 that were impermeable to amikacin. Morse et al (13) described chromosomal mutants of gonococcal strains with reduced permeability in the outer membranes, which exhibited decreased antibiotic accumulation. Bryan et al (1) had strains of *P. aeruginosa* resistant to all aminoglycosides, that did not produce any gentamycin-inactivating enzymes; no drug accumulation was detected inside the cells. Lundback & Nordstrom (10) described mutations in *E. coli* K12 that involved synergism of two different mechanisms, e.g., antibiotic-inactivating enzymes together with alterations in envelope components leading to decreased streptomycin uptake. Weisblum (19) postulate that *S. aureus* became inducibly resistant to erythromycin by N6-methylation of adenine in 23S ribosomal RNA. The ribosomes from these cells had a lower affinity for erythromycin than those from sensitive strains; and erythromycin remained unchanged after incubation with extracts of resistant cells, thus excluding inactivating enzymes. In the case of beta-lactam antibiotics, Lacey (9) and Medeiros (11) affirm that beta-lactamase is usually inducible; after exposure to a subinhibitory concentration of the drug, the cells produce 50-80 times more enzyme than the uninduced bacteria. Beta-lactamases can either be plasmid- or chromosomally determined; the former are constitutive and the latter are inducible in most *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* strains.

The 50 wild-type strains used in this study were clinical isolates from different hospital sources isolated during five years. The mechanisms of acquired resistance must inevitably vary considerably. The chance of occurring similar mutations "in vitro" during therapy is obviously difficult to assess. But if it happens, widespread use of the drugs will favour the selection of the resistant mutants, which can rise in prevalence first locally, and then will spread worldwide.

Acknowledgements

We thank Prof. Dr. Luís R. Trabulsi for his advices and Dr. José Antônio Maluf de Carvalho for kindly supplying the bacterial strains.

References

1. Bryan, L.E.; Haraphonse, R. & Van den Elsen, H.M. - Gentamicin resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* associated with diminished gentamicin accumulation and no detectable enzymatic modification. *J. Antibiot.*, 29:743-752, 1976.
2. Chopra, I. - Antibiotic resistance resulting from decreased drug accumulation. *Br. Med. Bull.*, 40:11-17, 1984.
3. Davies, J. - Resistance to aminoglycosides: mechanisms and frequency. *Rev. Infect. Dis.*, 5:261-267, 1983.
4. Davies, J. & Smith, D.I. - Plasmid determined resistance to antimicrobial

- agents. Ann. Rev. Microbiol., 32:469-518, 1978.
5. Ellner, P.D. & Neu, H.C. - The inhibitory quotient. A method for interpreting minimum inhibitory concentration data. J. Am. Med. Ass., 246:1575-1578, 1981.
6. Grieco, M.H. - Antibiotic resistance. Genetics of drug resistance. Med. Clin. N. Am., 66:25-37, 1982.
7. Hancock, R.E.W. - Aminoglycoside uptake and mode of action with special reference to streptomycin and gentamicin. II. Effects of aminoglycosides on cells. J. Antimicrob. Chemoth., 8:429-445, 1981.
8. Hull, R.; Klinger, J.D. & Moody, E.E.M. - Isolation and characterization of mutants of *Escherichia coli* K12 resistant to the new aminoglycoside antibiotic, amikacin. J. General Microb., 94:389-394, 1975.
9. Lacey, R.W. - Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci. Br. Med. Bull., 40:77-83, 1984.
10. Lundback, A.K. & Nordstrom, K. - Mutations in *Escherichia coli* K12 decreasing the rate of streptomycin uptake: synergism with R-factor-mediated capacity to inactivate streptomycin. Antimicrob. Agents Chemoth., 5:500-508, 1974.
11. Medeiros, A.A. - Beta-lactamases. Br. Med. Bull., 40:18-27, 1984.
12. Miller, M.H.; Edberg, S.C.; Mandel, L.J.; Behar, C.F. & Steigbigel, N.H. - Gentamicin uptake in wild-type and aminoglycoside resistant small colony mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemoth., 18:722-729, 1980.
13. Morse, S.A.; Lysko, P.G. & McFarland, L. - Gonococcal strains from homosexual men have outer membranes with reduced permeability to hydrophobic molecules. Infect. Immun., 37:432-438, 1982.
14. Reynolds, P.E. - Resistance to the antibiotic target site. Br. Med. Bull., 40:3-10, 1984.
15. Shannon, K. & Phyllips, I. - Mechanism of resistance to aminoglycosides in clinical isolates. J. Antimicrob. Chemoth., 22:358-363, 1982.
16. Saunders, J.R. - Genetics and evolution of antibiotic resistance. Br. Med. Bull., 40:54-60, 1984.
17. Soares, L.A. & Trabulsi, L.R. - Atividade antibacteriana "in vitro" de gentamicina, tobramicina e sisomicina. Rev. Microb. (S.Paulo), 10:1-5, 1978.
18. Szybalski, W. & Bryson, V. - Genetic studies on microbial cross resistance to toxic agents. I. Cross resistance of *E. coli* to fifteen antibiotics. J. Bact., 64:489-499, 1952.
19. Weisblum, B. - Inducible erythromycin resistance in bacteria. Br. Med. Bull., 40:47-53, 1984.

USO DA ENTEROTOXINA PARCIALMENTE PURIFICADA PARA A OBTENÇÃO DE ANTISSORO VISANDO O DIAGNÓSTICO DAS TOXINFECÇÕES ALIMENTARES POR CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

João Carlos de Oliveira Tórtora
 & Selma Soares de Oliveira

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

Resumo

Antissoros específicos, estáveis, com título de até 1/60, para diagnóstico das toxinfecções alimentares por *Clostridium perfringens* foram obtidos com emprego da enterotoxina parcialmente purificada.

Summary

Use of partially purified enterotoxin to obtain antiserum for diagnosis of Clostridium perfringens food poisoning.

Specific antisera for diagnosis of *Clostridium perfringens* food poisoning were obtained employing partially purified enterotoxin. The sera were stable and reactive until 1/60 dilution.

Nos países em desenvolvimento a precariedade das condições sanitárias, da fiscalização de alimentos e a falta de prioridade no controle das toxinfecções alimentares contribuem para a sua maior ocorrência e incentivam a crença da população de que essas doenças sejam sempre de evolução benigna, ocorrendo sem o conhecimento das autoridades sanitárias. A deficiência de laboratórios e de pessoal capazes de procederem a análise de amostras fecais e dos alimentos limita e retarda o conhecimento de fatores relacionados a essas doenças em diversos países. No Brasil, só recentemente têm sido descritos surtos de toxinfecção alimentar por *C. perfringens* (Serrano, A.M., Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, S. Paulo, 1976; Salzberg, S.P. & col. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 13:26-30, 1982; Schocken-Iturrino, R.P. & Col. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 17:228-233, 1986) embora o seu envolvimento seja conhecido desde 1945 (McClung, L.S.J. Bacteriol., 50:229-231, 1945). A necessidade de obtenção de soros para o reconhecimento imunológico das bactérias produtoras de enterotoxina, fator fundamental no diagnóstico das toxinfecções, desestimula muitos estudos. A possibilidade de emprego da enterotoxina de *C. perfringens* parcialmente purificada por precipitações com sulfato de amônio (Granum, P.E. & Whitaker, J.R., Appl. Env. Microbiol., 39:1120-1122, 1980) para obtenção de antissoros, com títulos estáveis durante três e ainda úteis após seis anos da obtenção, pode estimular o diagnóstico das toxinfecções por esta bactéria em laboratórios com menores recursos materiais. Culturas enterotoxigênicas de *C. perfringens* (NCTC 8239 e NCTC 8798) foram cultivadas a 37°C durante 24 horas em 12ml do meio de tioglicolato (135-C BBL) regenerado, após o que todo o volume foi inoculado em 500ml do meio, incubando-se nas mesmas condições. Trezentos mililitros destas culturas foram semeados em 5500ml do meio de Duncan-Strong (Appl. Microbiol., 16:82-89, 1968) ou de Tórtora (Appl. Env. Microbiol., 47:1172-1174, 1984). Após 15 a 18 horas a 37°C a microscopia evidenciou até 90% de esporos intracelulares e as culturas foram

refrigeradas, concentradas e a enterotoxina purificada segundo Granum & Whitaker, suprimindo-se a filtração em sephadex. Soluções purificadas, com volume total de 5,5ml apresentaram 5,16 e 6,23mg/ml de proteínas e título de 1/400 e 1/700, respectivamente, em imunodifusão (Stark, R.L. & Duncan, C.L., Infect. Immunity, 4:89-96, 1971) e em camundongos (Sakaguchi, G. & col., Appl. Microbiol., 26:762-767, 1973). Doses de 1ml, espaçadas em três dias, exceto a última (30 dias), contendo 2,9,12,29,29 e 145 μ g de proteínas foram inoculadas em coelho por via subcutânea empregando-se igual volume de adjuvante completo de Freund. Antissoros específicos, quando diluídos 1/5 ou mais, foram obtidos por punções cardíacas, cinco, dez e quinze dias após as inoculações. O título máximo, em imunodifusão, foi 1/60, sem variação significativa após três anos sob refrigeração ou congelamento. Após seis anos o título máximo foi 1/8, sendo usados diluídos 1/2 ou sem diluição para o reconhecimento de culturas enterotoxigênicas e diagnóstico de um surto de toxinfecção alimentar por *C. perfringens* ocorrido em Petrópolis, RJ.

USE OF COMPLEMENT FIXATION TEST IN THE DIFFERENTIATION OF BRUCELLA ABORTUS AND YERSINIA ENTEROCOLITICA SEROGROUP 09 EXPERIMENTAL INFECTION IN BOVINE

Luis Antonio Mathias
Aramis Augusto Pinto
Raul José Silva Girio
& Dilermando Perecin

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Campus de Jaboticabal - UNESP
São Paulo State, Brazil

Summary

The results of an experiment aiming at verifying the possibility of differentiating, by the complement fixation test, between brucellosis and yersiniosis in female calves experimentally infected with *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 09 are reported.

Bovines infected with *B. abortus* showed complement fixing antibody titres against *B. abortus* and against *Y. enterocolitica* 09 somatic antigen, while bovines infected with this microorganism showed also antibody titres against *Y. enterocolitica* 09 flagellar antigen.

The results showed that by complement fixation test brucellosis and yersiniosis can be differentiated in experimentally infected cattle by researching antibody titres against somatic antigen of both bacteria and against *Y. enterocolitica* 09 flagellar antigen.

Resumo

*Uso da reação de fixação de complemento na diferenciação entre infecção experimental por *Brucella abortus* e por *Yersinia enterocolitica* sorogrupo 09 em bovinos*

O experimento teve o objetivo de verificar a possibilidade de se diferenciar brucelose de yersiniose, através da reação de fixação de complemento, em bezerras experimentalmente infectadas.

Os animais infectados com *B. abortus* apresentaram títulos fixadores de complemento contra *B. abortus* e contra o antígeno somático da *Yersinia enterocolitica* sorogrupo 09, enquanto que os bovinos infectados com este microrganismo apresentaram ainda títulos de anticorpos contra o antígeno flagelar da *Y. enterocolitica* 09.

Os resultados indicaram que a brucelose pode ser diferenciada da Yersiniose, através da reação de fixação de complemento, em bovinos experimentalmente infectados, pela pesquisa dos títulos de anticorpos contra os抗ígenos somáticos de ambas as bactérias e contra o antígeno flagelar da *Y. enterocolitica* 09.

Introduction

Since the discovery of the serological cross-reaction between smooth *Brucella* and *Yersinia enterocolitica* serogroup 09 (1), several researches have been undertaken with the purpose of devising techniques able to differentiate between both

infections.

These studies consisted mainly in comparing the titre obtained against homologous with heterologous somatic antigens.

However, an important step to idealize laboratorial techniques to distinguish brucellosis from yersiniosis consisted in taking advantage of the fact that *Y. enterocolitica* 09 is motile when cultivated around 22°C and non-motile when cultivated around 37°C while *Brucella* is always non-motile. Thus, animals infected with *Y. enterocolitica* 09 develop antibodies against somatic (O) and flagellar (H) antigens while animals infected with *Brucella* develop only antibody against O antigen.

Corbel & Cullen (7) verified that homologous titres usually exceed heterologous titres and that *Brucella* could not completely remove anti-*Yersinia* antibody from *Yersinia* positive serum, being these residual antibodies directed against *Y. enterocolitica* H antigen. However, Mittal & Tizard (9, 10, 12, 13, 11) explored the fact by the first time, through devising a technique able to differentiate brucellosis from yersiniosis; in a set of works they demonstrated that it was possible by tube agglutination and microplate agglutination tests to determine differences between both infections.

An et alii (4), by using O and H antigens, attempted to differentiate brucellosis from yersiniosis by agar gel precipitation and counterimmunolectrophoresis tests and verified that the tests did not show enough sensibility to justify its usage in differential diagnosis.

This work aims at verifying the possibility of differentiate brucellosis from yersiniosis by complement fixation test, studying the occurrence of serological cross-reaction between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 09 in experimentally infected cattle, employing *Y. enterocolitica* 09 H antigen.

Material and Methods

Bacterial strains

Brucella abortus strain 19 and *Yersinia enterocolitica* serogroup 09 strain IP-383 (Institut Pasteur) grown at 22°C in tryptic soy broth (TSB - Difco) were used.

Animals

The work was carried out in female calves aging 5 to 11 months, without agglutination and complement fixing antibody titres against *B. abortus* and *Y. enterocolitica* 09 O and H antigens before inoculation. Three groups of animals were studied.

Group 1 - seven female calves were inoculated subcutaneously with 2 ml of a suspension containing 27×10^9 viable *Brucella abortus* per milliliter. Serum samples were obtained on the day of inoculation and thereafter 6, 9, 14, 20, 30, 55 and 98 days.

Group 2 - seven female calves were submitted to three subcutaneous inoculation of a suspension containing 3×10^8 viable *Yersinia enterocolitica* serogroup 09 per milliliter.

On the first inoculation each animal received 2 ml of the suspension, on the second, 21 days after the first, 3 ml and on the third inoculation, 38 days after first, each animal received 4 ml.

The animals were sampled on the day of inoculation and on days 6, 9, 14, 20, 27, 31, 44, 51, 70 and 100 afterward.

Group 3 - four female calves were submitted to three subcutaneous inoculation of sterile TSB, following the scheme used for *Y. enterocolitica* 09 infected group.

Antigens used on serological tests

Brucella abortus - The antigen used was the standard, consisting in a suspension of *B. abortus* strain 1.119/3.

Yersinia enterocolitica 09 somatic antigen (O) - This antigen was prepared in Roux flasks containing TSB plus 1.5 per cent agar.

Diluent was saline with 0.5 per cent phenol and opacity was adjusted visually against the concentration of the *B. abortus* standard antigen, according to Mittal & Tizard (9, 10).

Yersinia enterocolitica 09 OH antigen for H agglutination test - The microorganism was inoculated in the center of a Petri dish containing TSB plus 0.45 per cent agar. After incubation for 48 hours at 22°C, a sample was taken from the grown border and inoculated in the center of another dish. This procedure was repeated until the growth invaded all the dish in approximately 36 hours, aiming at stimulating bacterial motility (15).

A sample from the border of dish grown was inoculated in tubes containing TSB and subsequently was incubated at 22°C for 22 - 24 hours. The culture was centrifuged at 1,500 rpm for 5 minutes and the sediment washed twice in saline with 1 per cent formol. Thereafter it was filtrated in sterile gauze and the concentration adjusted visually to the *B. abortus* standard antigen (9, 10).

Yersinia enterocolitica 09 H antigen - The same procedure described for OH antigen to stimulate bacterial motility was also used to elaborate the antigen for determining the antibody titres against *Y. enterocolitica* H antigen by complement fixation test.

After centrifugation and washing twice in sterile physiological saline, the sediment was put in a flask with glass beads and agitated for 30 minutes, to separate flagella from bacterial body (15). Thereafter it was centrifuged at 4,000 rpm for 15 minutes and the supernatant was centrifuged again at 10,000 rpm for 15 minutes. To remove O antigen residues, guinea-pig anti-*Brucella abortus* serum was added to the supernatant. The mixture was incubated for 4 hours at 37°C in water bath and for 20 hours at 4°C and thereafter centrifuged at 3,000 rpm for 20 minutes. After absorption, 2 per cent of chloroform was added and the antigen was stored at 4°C.

Serological tests - Agglutinating and complement fixing antibody titres against *B. abortus* and *Y. enterocolitica* 09 O and H antigens were researched in all experimental animal sera.

Complement fixation tests - Complement fixation tests were performed in test tubes using the 50 per cent hemolytic end point according to the technique described by Bier et alii (15). All sera were inactivated at 56°C for 30 minutes and then followed by twofold dilutions, starting with the dilution 1:5.

Agglutination tests

O agglutination - For researching agglutinating antibody titres against *B. abortus* and *Y. enterocolitica* 09 O antigens the method was that usually applied on brucellosis serological diagnosis (3).

H agglutination - The agglutinating antibody titres against *Y. enterocolitica* 09 H antigen was determined based on the technique employed by Mittal & Tizard (9).

Statistical examination - The obtained data was analysed by analysis of variance.

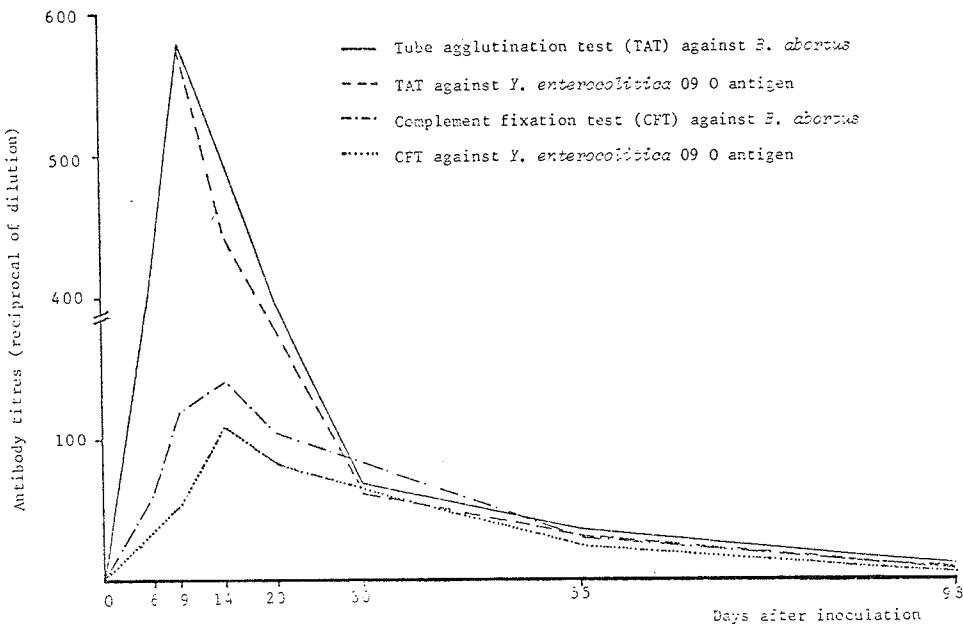
Results

Brucella abortus infected bovines

The results are summarized in Figure 1. As expressed, the means of antibody titres obtained against O homologous antigen were never inferior to the means obtained against heterologous O antigen and by the complement fixation test this

difference was more evident. The highest mean of agglutinating antibody titres obtained against both somatic antigens occurred on day 9 and the highest mean of complement fixing antibody titres occurred on day 14 after inoculation.

Figure 1 - Arithmetic means of agglutinating and complement fixing antibody titres, against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serogroup 09 somatic (O) antigen, in bovines infected with *B. abortus*.



Agglutinating antibody titres showed against *B. abortus* by bovine infected with this microorganism did not differ significantly of titres showed against *Y. enterocolitica* 09 O antigen. Homologous titres were several times higher, many times equal and never inferior to heterologous titres.

Agglutinating antibody titres against *Y. enterocolitica* 09 H antigen in sera from animals infected with *Brucella abortus* was not detected.

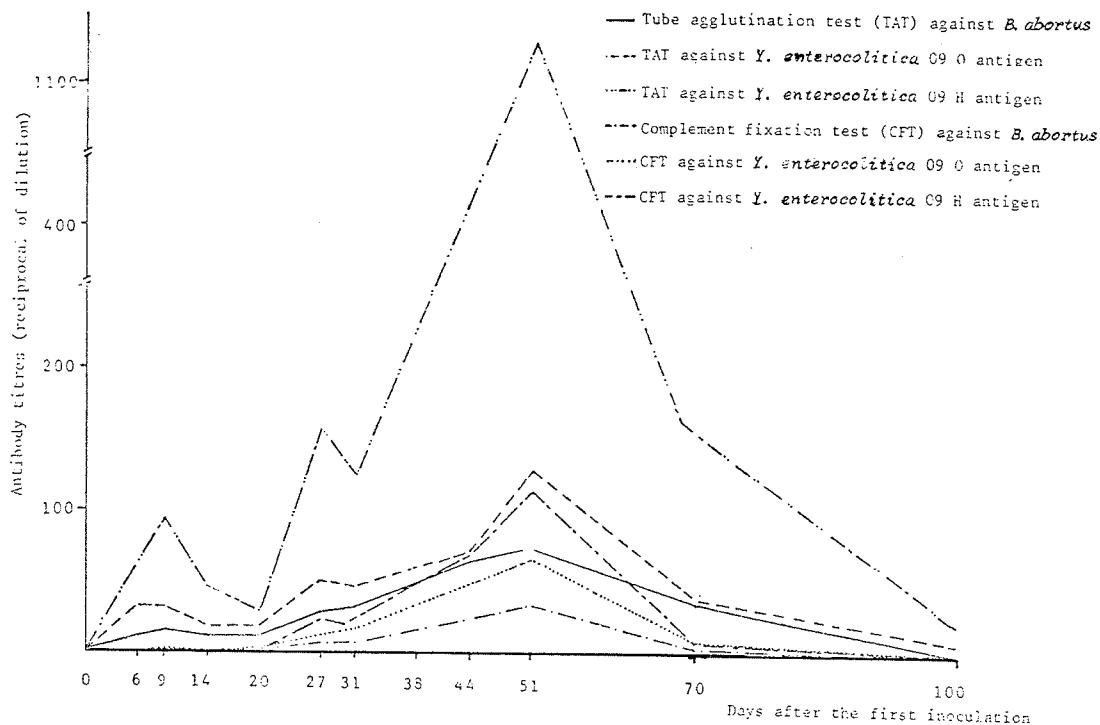
The complement fixation test was sometimes able to reveal more differences between somatic antigens of both bacteria than was tube agglutination test. In spite of this, homologous titres similar to heterologous titres were observed and statistical analysis did not reveal significative difference between both titres.

B. abortus infected bovines did not show complement fixing antibody titres against *Y. enterocolitica* 09 H antigen. However, it must be mentioned that when submitted to complement fixation test by using H antigen before absorption with anti *Brucella* serum, some sera showed titres. This revealed that *Y. enterocolitica* 09 somatic antigen was still present. This fact could be avoided by absorption of agglutinins.

Yersinia enterocolitica serogroup 09 infected bovines - Figure 2 shows that in all serological tests the highest titre mean occurred on day 51, i.e., 13 days after the third inoculation. The means of antibody titres against homologous O antigen were higher than the mean of titres obtained against heterologous antigen. Agglutinating titres obtained against *Y. enterocolitica* 09 H antigen were superior to titres verified in all other tests.

The greater number of the *Y. enterocolitica* 09 infected animals did not show a good serological response against somatic antigen of both bacteria and it was necessary three inoculations for obtaining a more evident response.

Figure 2 - Arithmetic means of agglutinating and complement fixing antibody titres, against *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* serogroup 09 somatic (O) and flagellar (H) antigens, in bovines infected with *Y. enterocolitica* 09.



Statistical analysis did not show significative difference between agglutinating antibody titres obtained against both O antigens, although, usually, homologous titres had been superior to heterologous titres.

The serological response showed by *Y. enterocolitica* 09 infected animals against H antigen was higher than the response showed against O antigens, and one animal showed agglutinating titre of 1:6,400 51 days after the first inoculation and 13 days after the third inoculation.

Also on that group, the complement fixation test was able to reveal more differences between titres obtained against O antigens, when compared with tube agglutination test. Titres obtained against homologous O antigen were, usually, higher than titres obtained against heterologous antigen, although significative difference between both had not been revealed by statistical analysis.

Complement fixation test showed antibody titres against *Y. enterocolitica* 09 H antigen only after the second inoculation with this bacteria. The highest arithmetic mean of the obtained titres was 1:114 and 100 days after the first inoculation none animal showed any titre.

Control group

Bovines of control group did not show any antibody titre in all tests.

Discussion

In spite of the transitory and not very high response, three out of seven *Y. enterocolitica* 09 infected bovines showed at least once agglutinating titres

against *B. abortus* higher or equal to 1:100, enough to be classified as positives to brucellosis.

Corbel (8), by experimental inoculation in bovines, also observed a transitory serological response and concluded that, once agglutinating antibody titres had reduced rapidly, it was unlikely that *Y. enterocolitica* 09 would cause an animal to become a persistente reactor to diagnostic tests for brucellosis. However, there are several reports about *Y. enterocolitica* 09 isolation from animals that showed serological titres against Brucella and Brucella isolation was not obtained (2, 6, 14, 16).

One of the ways to differentiate the infections caused by these two microorganisms consists of researching eventual differences that serological tests can evidence between antibody titres obtained against homologous and heterologous somatic antigens. In the present work, the differences between homologous and heterologous titres, by tube agglutination and complement fixation tests, was not constant, although by complement fixation test, usually, that difference was clearer. Corbel & Cullen (7) and Sunaga et alii (16) observed similar complement fixing titres between both somatic antigens in *Y. enterocolitica* 09 infected animals.

Once the routine tests do not show consistently the difference between antibody titres against both somatic antigens, and so to constitute of a reliable criterion for differentiation between brucellosis and yersiniosis, the research of antibodies against *Y. enterocolitica* 09 H antigen arise as an alternative to distinguish those infections. Corbel & Cullen (7) observed that absorption with Brucella organisms could not remove completely all anti-Yersinia antibody from *Yersinia* positive serum while *Yersinia* antigens could and that these residual antibodies were directed against Yersinia flagellar antigen.

Mittal & Tizard (9) work, showing that brucellosis could be differentiated from yersiniosis by the research of antibodies against *Y. enterocolitica* 09 H antigen by means of tube agglutination test, cleared the perspective of using other tests to research antibody titres against this antigen. Mittal & Tizard (13) suggested the use of a microplate agglutination test but verified that the obtained titres were low and the technique could be used in association but not in substitution to conventional serology. AN et alii (4) assayed the agar gel precipitation test but concluded that the low sensibility dissuaded the use of this test to differentiate the infections.

In the present work, the purpose was to employ the complement fixation test on differentiation between brucellosis and yersiniosis. The results revealed that bovines infected with *B. abortus* did not show antibody titres against *Y. enterocolitica* 09 H antigen while bovines infected with *Yersinia* did.

These results indicate that the research of antibodies against *Y. enterocolitica* 09 flagellar antigen by the complement fixation test was able to distinguish *B. abortus* from *Yersinia enterocolitica* 09 experimental infection. However, it is convenient to refer that tube agglutination test showed higher sensibility to reveal antibodies against H antigen.

Thus, the obtained results led to the conclusion that tube agglutination and complement fixation tests are able to differentiate brucellosis from yersiniosis in experimentally infected cattle. To obtain this differentiation it is important considering that antibody titres showed against homologous O antigen are, usually, but not always, higher than antibody titres showed against heterologous O antigen, and *Y. enterocolitica* 09 infected animals show antibodies against O and H antigens, as already observed by Mittal & Tizard (9, 10, 12).

References

1. Ahvonan, R.; Janson, E.; Aho, R. Marked cross-agglutination between Brucella and a subtype of *Yersinia enterocolitica*. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 75:291-5, 1969.

2. Akkermans, J.P.W.M. & Hill, K.W. *Yersinia enterocolitica* serotype 9 infection as a factor interfering with the serodiagnosis of *Brucella* infections in swine. *Neth. J. Vet. Sci.*, 5(1):73-80, 1972.
3. Alton, G.G.; Jones, L.M.; Pietz, D.E. Las técnicas de laboratorio en la brucellosis. 2 ed. Ginebra, Organización Mundial de la Salud. (Serie de monografias, 55). 1976.
4. An, S.H.; Kim, K.H.; Park, Y.H.; Kim, D.S. Serological tests to differentiate between animals infected with *Yersinia enterocolitica* IX and those infected with *Brucella abortus*. *Res. Rep. Rural Develop.*, 24(LV):106-11, 1982.
5. Bier, O.; Siqueira, M.; Esteves, M.B. Quantitative studies of complement fixation. I-A simplified and accurate procedure based on 50 per cent hemolytic end point. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10(4):199-208, 1968.
6. Bockemuhl, J. & Roth, J. *Brucella*-titer bei subklinischen infektionen mit *Yersinia enterocolitica* serotype 0:9 in einem schweine-zuchtbetrieb. *Zbl. Bakt. Hyg.*, 240A:86-93, 1978.
7. Corbel, M.J. & Cullen, G.A. Differentiation of the serological response to *Yersinia enterocolitica* and to *Brucella abortus* in cattle. *J. Hyg. Cam.*, 68:519-30, 1970.
8. Corbel, M.J. The Nature of the antibody response to *Yersinia enterocolitica* serotype IX in cattle. *J. Hyg. Camp.*, 71:309-23, 1973.
9. Mittal, K.R. & Tizard, I.R. A simple technique to differentiate between animals infected with *Yersinia enterocolitica* IX and those infected with *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.*, 26:248-50, 1979 a.
10. Mittal, K.P. & Tizard, I.R. Experimental studies on the serological relationships between *Yersinia enterocolitica* and *Brucella abortus*. *Res. Vet. Sci.*, 27:354-10, 1979 b.
11. Mittal, K.R. & Tizard, I.R. Serologic response of pigs to experimental infection with *Yersinia enterocolitica* serotype 09 and *Brucella abortus*. *Am. J. Vet. Res.*, 42(3):443-6, 1981.
12. Mittal, K.R. & Tizard, I.R. Studies on the relationship between *Yersinia enterocolitica* IX and *Brucella abortus* agglutinins in naturally infected animals. *Res. Vet. Sci.*, 28:311-4, 1980 a.
13. Mittal, K.R. & Tizard, I.R. The microplate agglutination test: a simple technique to assist in the differentiation of bovine brucellosis and yersiniosis. *Vet. Rec.*, 106:403-5, 1980 b.
14. Nattermann, H.; Hörsch, F.; Zimmermann, H. H. *Yersinia enterocolitica* infektionen in schweinebeständen und ihre differentialdiagnostische bedeutung. *Monat. Vet.*, 35 (6):225-7, 1980.
15. Peluffo, C. Método simplificado de diagnóstico serológico de las salmonelas. Serie de monografias científicas y técnicas nº 5. Buenos Aires, Centro Panamericano de Zoonosis. 1973.
16. Sunaga, Y.; Tani, F.; Mukai, K. Detection of *Yersinia enterocolitica* 09 infection in camels serodiagnosed as brucellosis. *Jap. J. Vet. Sci.*, 42(2):247-50, 1983.

**ANÁLISE CRÍTICA DA PORTARIA Nº 67 (1985) DO MINISTÉRIO DA SAÚDE
QUE ESTABELECE NORMAS PARA REGISTRO DE SANEANTES DOMISSANITÁRIOS,
COM AÇÃO ANTIMICROBIANA, NO TOCANTE AOS PRODUTOS DE USO HOSPITALAR:
PROPOSTA ALTERNATIVA**

Paulo Pinto Gontijo Filho

Rua Nascimento Silva nº 283 apto. 101
22421 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

O autor analisa a Portaria nº 67 do Ministério da Saúde que estabelece normas para registro de saneantes domissanitários no tocante aos produtos de uso hospitalar, apresentando elementos contra às exigências comuns para desinfetantes de superfície e aqueles destinados a objetos e equipamentos. Em função dos custos x benefícios resultantes dos requisitos muito rigorosos para os produtos a serem aplicados sobre pisos é apresentada uma proposta alternativa mais realista, para o registro dos mesmos.

Summary

Critical approach of the Act 67 from the Brazilian Health Ministry which establish guidelines for the registration of hospital disinfectant and sanitizer products: alternative proposal

The Act 67 from the Brazilian Health Ministry which gives directions for the registration of the hospital disinfectant and sanitizer products is discussed, with major critics against the microbiological tests required for the surface and equipment disinfectants. As costs x benefits do not support the current policies, mainly for the products used in the semi-critical areas disinfection, the author suggest that an alternative schedule for registration of this group of products.

Introdução

Os sanificantes e desinfetantes são amplamente utilizados principalmente em ambientes hospitalares para obter a remoção e destruição de microrganismos existentes em superfícies, equipamentos e outros materiais inanimados (4). No Brasil, o Ministério da Saúde (MS) através da Portaria nº 67 de 21 de fevereiro de 1985 (18) divide estes produtos em:

1. Desinfetante hospitalar de superfícies fixas, que são subdivididos em: produtos para uso em áreas críticas; produtos para uso em áreas semi-críticas; produtos para uso em áreas não críticas.
2. Desinfetante hospitalar de objetos e equipamentos que inclui como um sub-grupo o desinfetante hospitalar de mamadeira e bicos.
3. Esterilizante.

Esta Portaria reconhece a importância dos testes microbiológicos na análise prévia dos desinfetantes para seu registro na Divisão de Saneantes Domissanitários (DISAD) do MS e exige que sua ação antimicrobiana seja documentada contra os seguintes microrganismos (13, 18)- a. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa* - para os desinfetantes de áreas não

críticas;

- b. *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis BCG* e *Trichophyton mentagrophytes* - para os desinfetantes de superfície fixas de áreas críticas e semi-críticas, assim como para os desinfetantes de objetos e equipamentos;
- c. Os esterilizantes devem ser esporocidas (*Bacillus subtilis* e *Clostridium sporogenes*) além de ter o espectro microbicida exigido para os desinfetantes de objetos e equipamentos.

Discussão

Quando decidir se um desinfetante é ou não necessário? O objetivo da desinfecção é prevenir infecção, mas em termos mais práticos ela visa a redução da contaminação microbiana a um nível tal que uma dose infectante não possa atingir o sítio suscetível no paciente. Contudo, esta dose não pode ser facilmente determinada devido a variabilidade na virulência dos microrganismos e na resistência do hospedeiro (12).

Nos Estados Unidos é clássica a divisão dos desinfetantes de acordo com o nível de potência germicida em alto, intermediário e baixo. Os do primeiro grupo devem ter atividade esporocida e o desinfetante de nível intermediário, basicamente deve ter uma ação tuberculocida, além de atividade bacteriana para *S. aureus*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa* (9, 20).

De acordo com Engley (8) esta classificação data dos anos cinqüenta e está superada. Atualmente, na rotina hospitalar o uso de desinfetantes restringe-se a:

- a. esterilizar o material termolábil em autoclave de óxido de etileno ou através de produtos líquidos que têm glutaraldeído ou formaldeído, disponíveis no mercado brasileiro;
- b. desinfetar material médico-hospitalar.

Embora haja mais opções para a desinfecção os desinfetantes muitas vezes são os mesmos, diferindo apenas no tempo de contato que é superior a 10 horas para a esterilização e de 30 minutos na desinfecção (7).

Para ser registrado com desinfetante hospitalar naquele país (EUA) o produto deve ter ação contra *S. aureus*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa* (14). Aproximadamente 80% das infecções hospitalares são causadas por enterobactérias, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (21). No entanto, na desinfecção de itens semi-críticos (entram em contato com mucosas) há necessidade de uma desinfecção de alto nível, que envolve atividade tuberculocida (7, 17). Como foi referido no parágrafo anterior estes produtos requerem um tempo de exposição de pelo menos 30 minutos.

É importante que se assinale prioridades com base nos tipos de bactérias encontradas no ambiente ou as vias de transmissão das infecções. Assim, a desinfecção de pisos e outras superfícies fixas é muito menos relevante do que a de equipamento médico (4, 5). Os riscos de infecção a partir do ambiente e de material médico-hospitalar devem ser distribuídos em categorias e as prioridades alocadas proporcionalmente. Desta forma os pisos seriam classificados como de baixo risco e os equipamentos que penetram nos tecidos, são classificados como de alto risco (3).

O emprego de produtos tuberculocidas em pisos de hospitais é altamente questionável (10). O bacilo da tuberculose é considerado a bactéria mais resistente aos agentes químicos entre as bactérias vegetativas, em função da sua parede celular espessa e rica em lipídios complexos, razão pela qual é usado como microrganismo indicador, apesar de não ter uma maior importância na etiologia de infecções nosocomiais. A tuberculose transmite-se quase que exclusivamente por via aérea, através de resíduos ("droplet nuclei") de aerossóis com menos de 5mm, contaminados com o bacilo da tuberculose, que são formados e eliminados particularmente quando da tosse. Os bacilos presentes em grandes partículas sedimentam-se ou são retidos a nível do trato respiratório superior e portanto não representam um risco de infecção significante (9, 10).

Adicionalmente, é preciso assinalar que os resultados dos estudos da atividade tuberculocida dos diversos desinfetantes ainda não são conclusivos em função sobretudo do emprego de diferentes métodos de avaliação (2).

A exigência de uma atividade para *P. aeruginosa* exigida no registro de

desinfetantes destinados ao tratamento de mamadeiras e bicos não se justifica, pois este microrganismos não tem importância como causa de gastroenterites em lactentes, ao contrário dos colibacilos e salmonelas. Ele foi relacionado na Portaria nº 67 provavelmente pela sua maior resistência aos germicidas.

O sanificante é definido como um agente que reduz o número de bactérias contaminantes a níveis considerados seguros para a saúde pública (6). Os germicidas registrados como sanificantes nos EUA provavelmente cairiam na categoria dos desinfetantes de baixo nível (14).

Os microrganismos empregados para avaliar estes produtos (para superfície que entram em contato com alimentos e aqueles para superfícies que não entram em contato com alimentos) naquele país são amostras de *S. aureus* e *E. coli* através de teste de suspensão, que é menos rígido do que o teste de diluição de uso, tradicionalmente empregado para os desinfetantes, quando os microrganismos previamente secos e aplicados na superfície de carreadores são colocados em contato com o germicida.

O sanificante em contato por 30 segundos com suspensões contendo aproximadamente 10 bilhões de microrganismos (10^9)/ml, para ser aprovado, deve permitir uma redução de 99,99% (5 log) no número de microrganismos (1).

Enquanto a limpeza de pisos com detergentes e sanificantes reduz o número dos microrganismos de aproximadamente 80%, a adição de um desinfetante pode levar a redução a mais de 95%. É importante assinalar que numa enfermaria de hospital a recontaminação é rápida e as contagens podem voltar ao nível da pré-limpeza ou pré-desinfecção em 1 a 2h (5). Embora esta diferença possa não justificar o emprego de desinfetantes em áreas semi-críticas, que seriam submetidas a sanificação ele seria racional em áreas de alto risco (centros cirúrgicos, unidades de tratamento intensivo, etc.).

A situação atual dos desinfetantes no país é inquietante pois as exigências do Ministério da Saúde induzem os fabricantes no sentido de formulações muito concentradas e portanto mais caras e com maior chance de toxicidade para os pacientes e profissionais de saúde.

Em função dos vários aspectos considerados e sobretudo da questão de custos versus benefícios a nossa proposta para a avaliação de sanificantes e desinfetantes hospitalares no Brasil é a seguinte:

1. Sanificante para superfície fixa de área semi-críticas - Ação contra *S. aureus* e *E. coli* pelo teste suspensão, com uma redução de 99,99% nas populações microbianas testadas.
2. Desinfetante para bicos e mamadeiras - Ação contra *S. aureus* e *E. coli* pelo teste de diluição de uso da AOAC, utilizando-se 30 carreadores para cada microrganismo.
3. Desinfetante para superfície fixa de áreas críticas - Ação contra *S. aureus*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa* pelo teste de diluição de uso segundo o teste da AOAC.
4. Desinfetante para objetos e equipamentos - Ação contra *M. bovis* BCG, *S. aureus*, *S. choleraesuis* e *P. aeruginosa* através dos testes da AOAC.
5. Esterilizantes - Ação contra os microrganismos referidos no item anterior e esporos de *B. subtilis* e *C. sporogenes* segundo os testes de AOAC.

Referências Bibliográficas

1. Asbury, E.D. - Methods of testing sanitizers and bacteriostatic substances. In: Block, S.S. - Disinfection, sterilization and preservation. 3.ed. Philadelphia, Iea & Febiger, p.964-980, 1983
2. Ascenzi, J.M.; Ezzell, R.J. & Wendt, T.M. - Evaluation of carriers used in the test methods of the Association of Official Analytical Chemists. Appl. Environm. Microbiol., 51:91-94, 1986.
3. Ayliffe, G.A.J.; Babb, J.R. & Collins, B.J. - Environmental hazards - real and imaginary. Health & Social Services Journal, 86(Suppl. 3):3-4, 1976.
4. Ayliffe, G.A.J. & Collins, B.J. - Problems of disinfection in hospitals. In: Russell, A.D.; Hugo, W.B. & Ayliffe, G.A.J., eds.- Principles and practice of disinfection preservation and sterilization. Oxford, Blackwell Scientific

- Publication, p.244-261, 1982.
- 5. Ayliffe, G.A.J.; Collins, B.J. & Lowbury, E.J.L. - Cleaning and disinfection of hospital floors. *Brit. Med. J.*, 11:442-445, 1966.
 - 6. Block, S.S. - Federal regulation of disinfectants in the United States. In: - Block, S.S. ed.- *Disinfection, sterilization and preservation*. 3.ed. Philadelphia. Lea & Febiger, p.831-844, 1983.
 - 7. Centers for Disease Control - Guidelines for the prevention and control of nosocomial infections: hospital infections program. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, 1981.
 - 8. Engley, F.B. - Evaluate germicides carefully in absence of data, regulation. *Hospital Infection Control*, 14:46, 1986.
 - 9. Favero, M.S. - Sterilization, disinfection and antisepsis in the hospital, In:- Lennette, E.H., ed. *Manual of Clinical Microbiology*. 4.ed. Washington, DC., American Society for Microbiology, p.129-137, 1985.
 - 10. Finegold, S.M.; Sweeney, E.E.; Gaylor, D.W.; Brady, D. & Miller, L.G.- Hospital floor descontamination: controlled blind studies in evaluation of germicides. In:- *Antimicrobial agents and chemotherapy*. Washington, DC. American Society for Microbiology, 1962.
 - 11. Germer, J.S. & Favero, M.S. - CDC Guideline for handwashing and hospital environmental control. *Infection Control*, 7:231-243, 1986.
 - 12. Gontijo Filho, P.P. - A escolha de um desinfetante. *Ars Cvrandi*, IV:4, 1986.
 - 13. Gontijo Filho, P.P. & Romão, C.M.C.P.A. - Testes microbiológicos e o registro de sanitificantes, desinfetantes e antisépticos junto a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. *Rev. Microbiol.*, 17:143-147, 1986.
 - 14. Groshell, D.H.M. - Sterilization, disinfection and antisepsis. In: - Sonnenwith, A.C.R. & Jaret, H., eds.- *Gradwhol's clinical laboratory methods and diagnosis*. 8.ed. Saint Louis, CV Mosby, p.970, 1980.
 - 15. Horwitz, W. - Official methods of analysis of the Association of Official Agricultural Chemists. 13.ed. Washington, DC., Association of Official Analytical Chemists, 1980.
 - 16. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) - Manual técnico nº 04/85. Técnicas para controle de qualidade: avaliação da atividade antimicrobiana de saneantes domissanitários. Rio de Janeiro, Fundação Oswaldo Cruz, 1983.
 - 17. Mallisson, G.F. - The inanimate environment. In: - Bennett, J.V. & Brachman, P.S., eds. - *Hospital infections*. Boston, Little Brown, p.81-92, 1979.
 - 18. Ministério da Saúde - Portaria nº 67. Diário Oficial, Seção 1/3681, 1985.
 - 19. Rubin, J. - Agents for disinfection and control of tuberculosis. In:- Block, S.S. ed. - *Disinfection, sterilization and preservation*. 3.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, p.414-421, 1983.
 - 20. Spaulding, E.H. - Chemical disinfection and antisepsis in the hospital. *J. Hosp. Res.*, 9:5-31, 1972.
 - 21. Wenzel, R. - *CRC Handbook of hospital acquired infections*. Florida, CRC Press, 1981.

ESTUDO DE FATORES QUE INIBEM O CRESCIMENTO DE FERROBACTÉRIAS EM POÇOS

Valter Roberto Linardi

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

Sérgio Franga Leão

Deptº de Engenharia Sanitária
Escola de Engenharia UFMG

Cassilda Teixeira Carvalho

Coordenadoria de Desenvolvimento de Tecnologia de Esgotos
COPASA MG

& Daniel Adolpho Cerqueira

Seção de Laboratórios
COPASA

Resumo

Testou-se a eficiência dos desinfetantes: cloro livre e combinado, permanganato de potássio e sulfato de cobre em baixas e altas concentrações por longos e curtos períodos de tempo. Verificou-se também, o efeito do pH e da aerágão em poços contaminados por ferrobactérias. O pH é um dos principais fatores reguladores do crescimento destes organismos. Observou-se maior crescimento em pH 6,5 e inibição a partir de 7,5. Os desinfetantes se mostraram eficientes na inibição do crescimento das ferrobactérias em concentrações a partir de 4mg/l nos experimentos de longos períodos de tempo e nas concentrações de 10mg/l a partir de 6 horas de contato.

Summary

Study of factors that inhibit the growth of iron bacteria in wells

The efficiency of free and combined chorine, potassium permanganate and copper sulfate were tested in low and high concentrations for a long and a short period of time. The pH and aeration effects were also studied in wells contaminated by iron bacteria. The pH is the main regulation factor for growth of these organisms. The maximum growth was observed at pH 6,5 and inhibited occurred at pH 7,5. The disinfectants tested inhibited the growth of iron bacteria at a concentration of 4mg/l for a long period and 10mg/l with at least 6 hours of contact.

Introdução

O termo ferrobactérias não confere um significado taxonômico, mas biológico aos Rev. Microbiol., São Paulo, 19(2):159-165, Abr./Jun. 1988.

organismos. Ele caracteriza um grupo de microrganismos que depositam hidróxido férrico de forma morfológicamente distinta em seus caules ou bainhas (5). Estes organismos são capazes de absorver, oxidar e estocar o ferro e o manganês das águas por um processo contínuo, acumulando com o tempo uma grande quantidade de produtos oxidados (2). Os organismos integrantes destes grupos podem ser filamentosos ou unicelulares, autotróficos ou heterotróficos, e estão situados de acordo com a classificação em várias ordens, famílias e gêneros (1). No mínimo três diferentes grupos de microrganismos podem estar envolvidos na oxidação de íons ferrosos e férricos: os organismos com a capacidade de formar bainhas do gênero *Sphaerotilus*, *Leptothrix* e *Crenothrix*, as bactérias com caule do gênero *Gallionella* e certas espécies do gênero *Thiobacillus* (2,7). Do ponto de vista industrial, as ferrobactérias podem ser consideradas como organismos benéficos ou prejudiciais. Nos filtros de areia de sistema de tratamento de água eles podem ser úteis no processo de oxidação e precipitação de compostos de ferro e manganês contribuindo para a melhoria da qualidade da água. Entretanto, mais importante do que este efeito benéfico é a sua capacidade de formar em águas correntes e mananciais grandes massas de hidróxido férrico em forma de flocos que podem causar obstruções nas canalizações, diminuindo sua vida útil, além de modificar as características organolépticas das águas de abastecimentos. Normalmente, os poços contaminados com ferrobactérias são tratados com desinfetantes com objetivo de inibir o crescimento destes microrganismos.

No presente trabalho, usando águas de poços contaminados com ferrobactérias, testou-se a eficiência dos desinfetantes: cloro livre e combinado, permanganato de potássio e sulfato de cobre. Verificou-se também a ação do pH e aeração na inibição do crescimento das ferrobactérias.

Material e Métodos

Amostras e amostragens

Fonte - Foram utilizadas amostras de água de três poços localizados em Minas Gerais, e codificados como CF-07, I.06 e T-02, contaminados por ferrobactérias. As amostras foram colhidas em recipientes previamente esterilizados sem parada prévia dos poros, e o pH foi determinado no laboratório. Posteriormente, colheram-se amostras em intervalos de 1, 10, 20, 30 minutos e 1, 2, 3 e 6 horas de bombeamento após uma parada prévia dos poços de aproximadamente 12 horas. Para as amostras correspondente a 6 horas de bombeamento foram determinados os seguintes parâmetros físico-químicos e bacteriológico segundo Standard Methods 16 ed. (1): pH, turbidez, alcalinidade, manganês, oxigênio dissolvido, dureza total, nitrogênio amoniacal, ferro total, ferro dissolvido, sólidos totais, sólidos dissolvidos, coliformes totais e fecais.

Cultivo de ferrobactérias - Para testar a ação de pH, aeração e desinfetantes utilizou-se a técnica de cultivo descrita por Grainge & Lund (3), que consiste na esterilização por 121°C durante 15 min., de frascos erlenmeyer de 500ml, contendo um prego (fonte de Fe^{++}) e um bastão de vidro (suporte para o crescimento bacteriano), vedados com gaze e algodão para se permitirem trocas gasosas com o ambiente. Após esterilização, adicionavam-se 300ml de amostras de águas dos poços a serem testadas. O conjunto era incubado no escuro a 22°C.

Controle do crescimento das ferrobactérias - Foi feito a partir de lâminas coradas com ferrocianeto de potássio a 0,1N e HCl a 0,1N (1), dos flocos que se depositavam no fundo dos frascos e do material que se formava nos bastões de vidro. Posteriormente, utilizou-se a técnica de membrana filtrante (5) e inoculação no meio descrito no Wolfe(4,7). Na membrana filtrante, as amostras foram filtradas em filtro "Millipore" com $0,45\mu$ de porosidade e examinadas em microscópio, após sua secagem e embebição em óleo de cedro para torná-la transparente. Para o meio de Wolfe, inoculava-se 1,0ml das amostras durante sete dias. A formação de um anel na fase líquida do meio indicava a presença de ferrobactérias.

Efeito de pH - Os pH's das amostras, antes dos experimentos, foram 6,7,6,4 e 7,3 para os poços CF-07, I-06 e T-02, respectivamente. As amostras foram tamponadas nos valores 6,5 7,5 e 8,5 adicionando-se NaHCO_3 (0,10M) para o pH 8,5 e HCl (0,1N) para os pH's 7,5 e 6,5. A seguir 300ml das amostras eram distribuídas em frascos erlenmeyer preparados segundo a técnica descrita por Grainge & Lund (3). O controle de crescimento foi feito usando-se lâminas coradas a partir do segundo ao quinto dia de incubação. Os pH's não foram ajustados durante o experimento.

Efeito de aeração - Foram feitos experimentos com aeração contínua sem ou com tamponamento das amostras. Para aeração dos frascos, utilizou-se uma bomba de aquário, entretanto o fluxo de ar não foi medido. O controle de crescimento foi feito usando-se de lâminas coradas a partir de segundo ao quinto dia de incubação.

Ação dos desinfetantes - Os testes foram realizados com amostras de água de poços colhidos após 6 horas de bombeamento, e parada prévia de 12 horas. Foram realizados dois tipos de experimentos; usando-se desinfetantes em baixas concentrações por um longo período de tempo e altas concentrações por curtos períodos de tempo. As amostras de água a serem analisadas eram distribuídas em frascos segundo técnica descrita por Grainge & Lund (3), e somente no terceiro dia de incubação é que se adicionava o desinfetante a ser testado. Foram usados: cloro livre (borbulhamento de Cl_2 em água destilada), cloro combinado (reação do cloro livre com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em pH 8,3), permanganato de potássio nas concentrações de 2,4,6 e 8mg/l, respectivamente, e sulfato de cobre a 0,5mg/l. Após aplicação dos desinfetantes o pH foi mantido em 6,5 (poços C7-07 e I-06) e 7,5 (poço T-02). Testou-se também o efeito do pH no crescimento de ferrobactérias nas seguintes faixas: 6,5,7,5 e 8,5 tamponados a partir do terceiro dia. Para cada série de experimentos usaram 8 frascos erlenmeyer divididos em 2 lotes de 4 frascos. No primeiro lote dosava-se o desinfetante e pH e faziam-se as correções no conjunto de frascos onde se estava controlando o crescimento das ferrobactérias. O controle de crescimento foi feito diariamente, usando-se lâminas coradas a partir do terceiro dia.

Nos experimentos com desinfetantes em concentrações elevadas por um longo período de tempo usaram-se cloro livre, cloro combinado e permanganato de potássio nas concentrações de 10,50 e 100mg/l, nos tempos de 2, 6 e 24 horas respectivamente. A seguir, o desinfetante era neutralizado com tiossulfato de sódio. Foram realizados ensaios com amostras sem alteração do pH e com amostras tamponadas em pH 8,5. Os controles de crescimento foram feitos por meio da técnica de membrana filtrante e inóculo no meio de Wolfe (7).

Resultados e Discussão

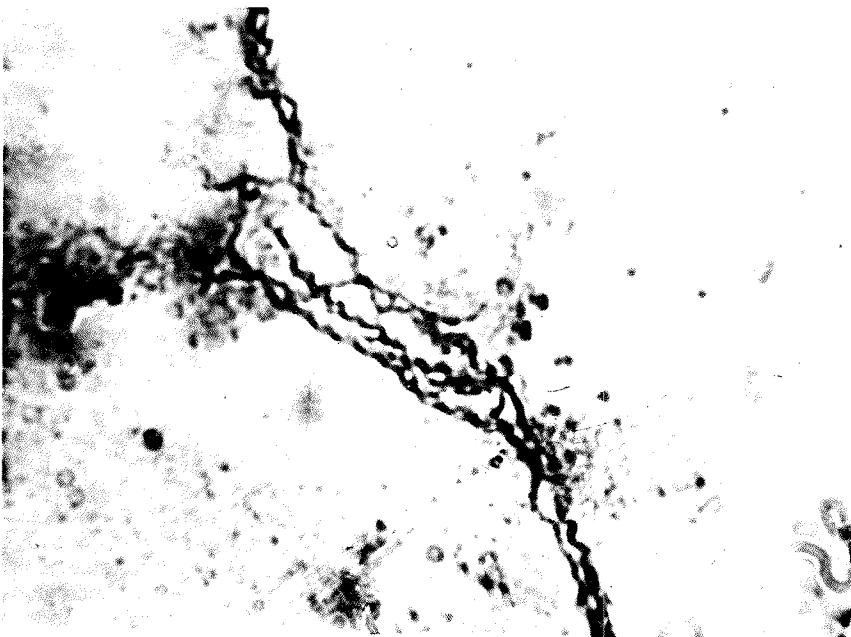
O aparecimento de flocos em grandes quantidades em poços de abastecimento exige medidas corretivas imediatas, às vezes, dependendo do nível de contaminação, há necessidade de paralisação do fornecimento de água. Para se testarem fatores capazes de inibir o crescimento do ferrobactérias deve-se levar em consideração os ensaios realizado a nível de laboratório, a reprodutibilidade dos ensaios de laboratório a nível de campo e a viabilidade econômica dos fatores que se estão testando.

A partir de flocos encontrados nos poços CF-07, I-06 e T-02 foram realizados exames microscópicos, e através de características morfológicas verificou-se que as ferrobactérias do gênero *Gallionella* apareciam com maior incidência (Figura 1). Constatou-se também em algumas preparações a presença de formas filamentosas, possivelmente, do gênero *Sphaerotilus* ou *Leptothrix*.

Verificou-se que o fator pH (Tabela 1), é importante no desenvolvimento das ferrobactérias. É nítido o maior crescimento em pH 6,5 tanto quanto a sua inibição quando o seu valor ultrapassa 7,5. O oxigênio dissolvido, introduzido por aeração, não apresentou evidências de ser um fator importante no controle das ferrobactérias.

A idéia de se fazer essa aeração era promover a oxidação do ferro solúvel, ferroso, antes de sua utilização pelas bactérias.

Figura 1 - Microfotografia de flocos presentes nos poços contaminados (x400), observa-se a forma típica do gênero *Gallionella*.



Fatores como concentração de ferro e de manganês, oxigênio, temperatura, pH, fonte de carbono afetam o crescimento das ferrobactérias (2). Portanto, numa tentativa de traçar um perfil físico-químico dos poços contaminados analisaram-se vários parâmetros de amostras colhidas nos vários tempos de bombeamento. A Tabela 2, corresponde à análise de amostras com 6 horas de bombeamento.

As amostras colhidas dos poços CF-07, I-06 e T-02 caracterizavam-se pela presença de flocos. Entretanto, sempre as amostras do poço I-06 apresentavam uma maior quantidade de flocos em relação as amostras dos poços CF-07 e T-02, e o último a menor quantidade. Na Tabela 2, entre os vários parâmetros, o pH e a alcalinidade destacam-se pela variação apresentada. Possivelmente, estes fatores sejam os responsáveis pela maior ou menor quantidade de flocos em um poço. Nos experimentos com desinfetantes em baixas concentrações, Tabela 3, 4 e 5, a adição do desinfetante somente a partir do terceiro dia teve como objetivo permitir o desenvolvimento de ferrobactérias presente nas amostras nos dois primeiros dias. Após aplicação do desinfetante, o pH era corrigido para os valores iniciais correspondentes a cada poço e mantido durante todo o experimento. Testou-se também o efeito do pH nas faixas 6,5 7,5 e 8,5 tamponadas a partir do terceiro dia, Tabela 3, 4 e 5. As tabelas 3,4 e 5 mostram que as ferrobactérias não foram totalmente eliminadas durante o experimento. O cloro livre parece ser mais eficiente em pH 6,5. Portanto, o uso desse desinfetante requer dosagem mais elevadas pelo fato de ser ele mais eficiente

Tabela 1 - Efeito do pH e aeração no crescimento de ferrobactérias.

Símbolos: a - Amostras colhidas sem parada prévia dos poços; b - Ferrobactérias/campo: r = raras; + = até 5; ++ = acima de 5; * Amostras tamponadas no início do experimento; ** Amostras não tamponadas - pH das amostras 6,7 (CF-07), 6,5 (I-06) e 7,3 (I-02).

Tabela 2 - Parâmetros analisados em três poços contaminados com ferrobactérias.

Símbolos: a - Correspondente a 6 horas de bombeamento, após parada prévia de 12 horas.

Parâmetros	Poços ^a	CF-07	I-06	T-02
pH		6,74	6,55	7,50
Turbidez (N.T.U.)		1,00	2,50	Nihil
Alcalinidade				
mg/l CaCO ₃	20,00	43,00	112,00	
Manganês mg/l	0,15	0,05	0,05	
O ₂ Dissolvido mg/l	3,80	18,48	5,60	
Dureza total mg/l CaCO ₃	28,00	40,00	92,00	
Nitrogênio				
Aminiacal/mg	0,05	0,05	0,05	
Ferro total mg/l	0,18	0,85	0,15	
Ferro dissolvido mg/l	0,12	0,35	0,10	
Sólidos totais mg/l	47,00	80,00	172,60	
Sólidos dissolvidos mg/l	43,10	74,90	161,50	
Coliformes totais/ 100 ml	5	140	< 2	
Coliformes totais/ 100 ml	2	< 2	< 2	

Tabela 4 - Ação de desinfetantes e pH no crescimento de ferrobactérias Poço I-06a.

Símbolos: a - Amostra com 6:00 horas de bombeamento, após parada prévia de 12 horas - pH 6,5; b - Ferrobactérias/campo: r = raras; + = até 5; ++ = acima de 5; * Crescimento antes da aplicação dos desinfetantes ou tamponamento das amostras; ** Após aplicação dos desinfetantes - pH mantido em 6,5; *** Amostras tamponadas a partir do 3º dia.

Desinfetantes mg/l	Dias de incubação					
	3*	4**	5**	6**	7**	
Cloro livre	2,0	r ^b	r	r	+	+
	4,0	r	r	r	r	r
	6,0	r	r	r	r	r
	8,0	r	r	r	r	r
Cloro combinado	2,0	+ ^b	r	r	r	r
	4,0	++ ^b	+	+	+	r
	6,0	+	r	r	r	r
	8,0	r	r	r	r	r
KMO ₄	2,0	r	r	r	+	+
	4,0	+	r	r	+	+
	6,0	r	r	r	+	r
	8,0	r	r	r	+	r
CuSO ₄	0,5	+	+	+	++	++
pH***	6,5	+	+	+	++	++
	7,5	+	+	+	+	r
	8,5	r	r	r	r	r

Tabela 3 - Ação de desinfetantes e pH no crescimento de ferrobactérias Poço CF-07.^a

Símbolos: a - Amostra com 6:00 horas de bombeamento, após parada prévia de 12 horas - pH 6,5; b - Ferrobactérias/campo: r = raras; + = até 5; ++ = acima de 5; * Crescimento antes da aplicação dos desinfetantes ou tamponamento das amostras; ** Após aplicação dos desinfetantes - pH mantido em 6,5; *** Amostras tamponadas a partir do 3º dia.

Desinfetantes mg/l	Dias de incubação					
	3*	4**	5**	6**	7**	
Cloro livre	2,0	r ^b	+	r	+	+
	4,0	r	r	r	r	+
	6,0	r	r	r	r	+
	8,0	r	r	r	r	r
Cloro combinado	2,0	r	r	r	++ ^b	++
	4,0	r	r	r	++	++
	6,0	+	r	r	+	+
	8,0	r	r	r	+	r
KMO ₄	2,0	r	r	r	+	+
	4,0	+	r	r	+	+
	6,0	r	r	r	+	r
	8,0	r	r	r	+	r
CuSO ₄	0,5	+	+	+	++	++
pH***	6,5	+	+	+	++	++
	7,5	+	+	+	+	r
	8,5	r	r	r	r	r

em pH 6,5. Portanto, o uso desse desinfetante requer dosagem mais elevadas pelo fato de ser ele mais eficiente em faixa de pH onde as ferrobactérias se desenvolvem mais facilmente. O cloro combinado mostrou ser mais eficiente em pH 7,5. O permanganato de potássio foi um bom inibidor, atuando de forma independente do pH. De maneira geral pode-se dizer que os desinfetantes, à exceção do sulfato de cobre, se mostraram eficientes na inibição do crescimento das ferrobactérias, quando sua concentração foi superior a 4,0mg/l. As amostras tamponadas em pH 8,5 inibiram o crescimento das ferrobactérias, confirmando os resultados obtidos na Tabela 1. Quando se usaram os desinfetantes cloro livre ou combinado e permanganato de potássio em concentrações mais elevadas por um curto período de tempo, verifica-se que são eficientes nas concentrações de 100mg/l a partir de 6 horas de contato, Tabela 6.

São importantes os métodos utilizados para o controle de crescimento de ferrobactérias. Nos experimentos com desinfetantes, entre as técnicas utilizadas, a inoculação no meio de Wolfe parece ser

a mais precisa, em relação a técnica da lâmina corada e membrana filtrante, pois somente os microrganismos viáveis é que crescem no meio de cultura. A Tabela 6, demonstra o que foi dito: presença de ferrobactérias nas membranas filtrantes e ausência de crescimento no meio de Wolfe. Entretanto, deve-se ressaltar que o meio de Wolfe foi desenvolvido para o crescimento de *Gallionella* (4) e alguns gêneros de ferrobactérias filamentosas não se desenvolvem em meios artificiais.

Projeto financiado pelo BNH-COPASA/MG
Superintendência de Tecnologia Ambiental
Coordenadoria de Tecnologia de Esgotos.

Tabela 5 - Ação de desinfetantes e pH no crescimento de ferrobactérias Poço T-02a.
Símbolos: a - Amostra com 6:00 horas de bombeamento, após parada prévia de 12 horas - pH 7,0; b - Ferrobactérias/campo: r = raras; + = até 5; ++ = acima de 5; * crescimento antes da aplicação dos desinfetantes ou tamponamento das amostras; ** Após aplicação dos desinfetantes - pH mantido em 7,5; *** Amostras tamponadas a partir do 3º dia.

	Desinfetantes mg/l	Dias de incubação				
		3*	4**	5**	6**	7**
Cloro Livre	2,0	r ^b	r	r	r	r
	4,0	++b	r	r	r	r
	6,0	++	r	r	r	r
	8,0	+b	r	r	r	r
Cloro Combinado	2,0	r	+	+	r	r
	4,0	r	+	+	r	r
	6,0	r	+	+	r	r
	8,0	+	++	+	r	r
KMO ₄	2,0	r	+	r	r	r
	4,0	+	++	+	r	r
	6,0	+	++	+	r	r
	8,0	+	+	r	r	r
CuSO ₄	0,5	+	+	+	+	+
pH***	6,5	+	+	r	r	r
	7,5	r	+	r	r	r
	8,5	r	+	r	r	r

Tabela 6 - Ação de concentrações elevadas de desinfetantes, no crescimento de fettobactérias, em curtos períodos de tempo.

Símbolos: * Controle de crescimento = (M.F.) - membrana filtrante, (M.W.) Inóculo no meio de Wolfe; (+) presença de ferrobactérias ou (-) ausência de ferrobactérias; ** SA - pH sem alteração; 8,5 - pH tamponado.

Concentração mg/l	CF-07			I-06			T-02		
	2	6	24	2	6	24	2	6	24
	M.F.	M.W.	M.F.	M.W.	M.F.	M.W.	M.F.	M.W.	M.F.
Cloro livre	10	+	+	-	+	-	+	-	+
	SA**	50	+	+	-	+	+	-	+
		100	+	-	+	-	+	-	+
Cloro combinado	10	+	+	-	+	-	+	-	+
	pH	50	+	-	+	-	+	-	+
		8,5	100	+	-	+	-	+	-
KMO ₄	10	+	+	-	+	-	+	-	+
	SA	50	+	+	-	+	-	+	-
		100	+	-	+	-	+	-	+
CuSO ₄	10	+	-	+	-	+	-	+	-
	SA	50	+	+	-	+	-	+	-
		100	+	-	+	-	+	-	+
RuO ₄	10	+	-	+	-	+	-	+	-
	pH	50	+	-	+	-	+	-	+
		8,5	100	+	-	+	-	+	-

Agradecimentos

Os autores agradecem o Prof. José Julião e os técnicos Siomara P. Assis e Frank D. Lamas pela participação no projeto.

Referência Bibliográficas

1. American Public Health Association, Standard Methods for the examination of water and wastewater, 16 ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1985.
2. Cullimore, D.R. & Mc Cann, A.E. - The identification, cultivation and control of iron bacteria in ground water. In: Skinner, F.A. & Shewan, J.M. eds. Aquatic Microbiology. London, Academic Press, p.219-260, 1970. (The Society Applied Bacteriology Symposium Series, 6).
3. Grainge, J.W. & Lund, E. - Quick culturing and control of iron bacteria. J. AWWA 61:242-245, 1969.
4. Kucera, S. & Wolfe, R.S. - A selective enrichment method for *Gallionella ferruginea*. J. Bacteriol., 74:344-349, 1957.
5. Iueschow, L.A. & Mackenthun, K.M. - Detection and enumeration of iron bacteria in municipal water supplies. J. Awwa, 54:751-756, 1962.
6. Pringsheim, E.G. & Weissner, W. - The Vitreoscillaceae: A family of colourless, gliding, filamentous organisms. J. Gen. Microbiol., 5:124-149, 1951.
7. Wolfe, R.S. - Cultivation morphology, and classification of the iron bacteria. J. Awwa, 50:1241-1249, 1958.
8. Wolfe, R.S. - Iron and manganese bacteria. In: Heukelekian, H. Dondero, N.C. eds. Principles and Applications in Microbiology. New York, John Wiley and Sons, p.82-97, 1964.

MOLDS FROM SOME BEACHES IN THE SOUTHERN AREA OF SÃO PAULO STATE (BAIXADA SANTISTA), BRAZIL

Adhemar Purchio
Walderez Gambale
& Claudete Rodrigues Paula

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

Resumo

Foi estudada a incidência de bolores em águas poluídas (Praia de São Vicente) e não poluídas (Praia de Bertioga), localizadas na costa do Estado de São Paulo, Brasil, durante o período de 12 meses.

Através de plaqueamento de 0,2 ml das amostras em Sabouraud dextrose agar adicionado de cloranfenicol, pH 5,0 e incubação a 25°C, foram realizadas 181 coletas, através das quais foram caracterizados 18 gêneros de bolores nas águas da Praia de São Vicente e 12 em Bertioga.

É enfatizado o achado de fungos não esporulados com frequências predominantes em ambos os locais e com diferenças estatisticamente significativas nas águas poluídas das praias de São Vicente.

Os resultados apresentaram um paralelismo com o índice de coliformes encontrados nas mesmas amostras, sugerindo a possibilidade da utilização da frequência relativa dos fungos não esporulados como indicadores de poluição microbiana em água do mar.

Summary

The authors studied the incidence of molds in the polluted waters of São Vicente Island beaches and non polluted ones of Bertioga located at São Paulo State coast in Brazil, during 12 months, in a total of 181 samples.

Through an experimental technique of plating 0,2 ml from the samples in Sabouraud Dextrose Agar (Chloramphenicol-100 µg/ml), pH 5,0 and incubation at 25°C, 18 genera of molds were characterized in the beaches of São Vicente Island (SVI) and 12 in Bertioga.

One must emphasize the finding of non sporulating fungi (NSF), the frequencies of which predominate in both sites and in a significative statistically way in the polluted waters of SVI beaches.

These results presented a parallelism from the coliform rates found in the same samples, suggesting a possibility of the utilization of NSF relative frequencies as a microbial pollution indicator of the coastal sea-water.

Introduction

The study of Johnson & Sparrow in 1961 (6) entitled "Fungi in Oceans and Rev. Microbiol., São Paulo, 19(2):166-171, Abr./Jun. 1988.

"Estuaries" was considered as an initial mark of the Mycological Marine Era. Those authors attested that the knowledge of the marine fungi was so incipient, when compared with that of the soil, that the mere acknowledgement of these microorganisms, as a part of a marine community, represented a great contribution. Morris (9) asserted that the acquired knowledge till that date, about the fungi existence in the different seas, was not but some part of an immense puzzle.

With this, one can assert that the scientific development in this section was slowly processed from 1968 (5,8,9,12).

Through several works consulted one verifies that there is no perfect definition of marine fungi because these microorganisms should grow and reproduce exclusively or predominantly either in the sea or in its substrate and, still, its good growth and reproduction should occur in marine rate salinity (5).

Therefore, in the absence of total ideal conditions for its growth and reproduction, its habitat would not be strictly marine but predominantly coastal where the waters are subjected to environmental effects occurred in coastal land.

The influence of salinity, especially in estuary waters where variation is intense, attracted the attention of several researchers (6). One knows hardly anything about the influence of temperature in the distribution of Ascomycetes and Fungi imperfecti.

A few publications describe different genera of fungi found in river water (2,3,10) while Dabrowa et al. (4) describe the isolation of the potentially pathogenic fungi of man in Californian coastal land. In the latter, several materials were collected such as algae, marine animals, feathers, etc., from which 33 fungi species were isolated.

In 1975, Hughes (5), published a very good bibliographic revision about this subject but only Simard (10) foresaw the possibility of employing yeasts as pollution indicators such as coliforms.

In the 14th edition of "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (1) there is an indication that in non polluted rivers there are greater numbers of real aquatic fungi than molds. Highly contaminated waters would present almost exclusively molds, including yeasts. Therefore, the increasing number of molds is indicative of the presence of organic material highly concentrated, as well as highly diversified microbiota is the indication of populational adaptation to that organic environment.

Thence, considering the pollution problem of the beaches in "Baixada Santista" and the lack of specific mycological data concerning this region, this work had the following objectives:

- 1 - To study the molds existing in the waters of São Vicente Island beaches (polluted) and Bertioga beaches (non polluted).
- 2 - To investigate the variation of the fungi genera in the mentioned ecosystems and their distribution according to the sampling points and climatic seasons.
- 3 - To study fungi adaptation in these substrates.

Material and Methods

São Vicente Island is located at the eastern extremity of "Baixada Santista" between Santo Amaro Island (East) and the coast of Praia Grande (West) in São Paulo State, Brazil.

Tourism is highly developed and the floating population, which excess 1,000,000 inhabitants is recognized by the real wall of skyscrapers along the beach. So by the summary description of conditions the established ecosystem in its beaches has its own characteristics and a high pollution average.

Bertioga, on the contrary, which conditions of balneability are excellent, is located up to the north, in the northern border of the so called Barra de Bertioga, not far from the mouth of the river Itapanháu and determines the peripheric line of Baixada Santista.

The sites where the samples were collected are shown on Tables 1 and 2; 181 sea Water samples (200ml) were collected from March to December 1976.

It was adopted as isolation media the Sabouraud dextrose agar (DIFCO) plus Chloramphenicol (100 µg/ml), plating aliquots of 0.2 ml, followed by the incubation at 25°C, for a period which varied from 5 to 15 days.

The identification was done following the usual mycological methods and it must be emphasized that the fungi which did not present fructification structures were picked up to others culture media such as potato-agar, cornmeal-agar and Czapecz agar.

When the non sporulating state persisted in these media, such fungi were included under the designation of Non Sporulating Fungi (NSF).

Statistical methods

For the study of the relations among the NSF the sporulating fungi and the coliforms frequencies in the sea water, the Pearson formula was applied

$$n = \frac{\Sigma (X Y)}{N \cdot O_x \cdot O_y}$$

The probable error was calculated by the formula

$$PE = 0,6745 \cdot \frac{1 - r^2}{\sqrt{N}}$$

Results

Through 181 samples collected in the waters of São Vicente Island (100) and Bertioga (81), 18 genera of fungi were isolated in the first and in the second 12 genera, adding in both the NSF whose frequencies are found on Tables 3 and 4.

Through Table 3, one can observe that the NSF presented the major frequency (36%) followed by *Penicillium* (24%), *Trichoderma*

(21%), *Aspergillus* (12%) and *Cladosporium* (11%). One notes that only the NSF and the *Trichoderma* were isolated in all sampling points of SVI.

In Bertioga (Table 4), NSF (25.9%) predominated followed by *Aspergillus* (23.4%), *Penicillium* and *Cladosporium* (14.8%) and *Trichoderma* (12.3%). Only the NSF and the *Aspergillus* were isolated in all sampling points.

The following genera were isolated, only in SVI, in low frequencies:

Table 1 - Localization of the sampling stations in São Vicente Island (Santos, Itararé and São Vicente*).

Symbols: * Beaches considered by CETESB as improper for sea-bathing (suspect and bad). (State Agency of Basic Sanitations).

Place	Beach	Sampling Stations
S1	Ponta da Praia	400 meters left from channel 6 (entrance of the estuary)
S2	Aparecida	In front of channel 5
S3	Boqueirão	In front of channel 3
S4	Gonzaga	In front of channel 2
S5	José Menino	80 meters on the left of the out-fall in construction
I6	Itararé	100 meters at right of Pedra da Peiticeira
I7	Itararé	In front of point 2
I8	Itararé	In front of Saldanha da Gama Street
SV9	São Vicente	On the right of the avenue which connects with Porchat Island
SV10	São Vicente	In front of the small fountains, 20 meters far from the Fourth Centenary monument

Table 2 - Localization of the sampling stations in Bertioga*.

Symbols: * Beaches considered by CETESB as proper for sea-bathing (excellent and very good). (State Agency of Basic Sanitation).

Place	Beach	Sampling Stations
E1	Enseada	In front of Bertioga's G.E.
E2	Enseada	In front of S.E.S.C.'s sea-side resort
E3	Enseada	100 meters before the end of the beach (South)
SL4	São Lourenço	100 meters before the end of the beach (South)
SL5	São Lourenço	100 meters before the end of the beach (North)
G6	Guaratuba	100 meters from the start of the beach (South)
G7	Guaratuba	In the middle of the beach
G8	Guaratuba	100 meters from the end of the beach (North)
B9	Boracéia	100 meters from the start of the beach (South)

Table 3 - Frequencies of the genera of molds isolated at different sampling stations of São Vicente Island beaches*.

Symbols: 10 samples from each station - Totaling 100 samples.

Genera	Sampling stations										F=8
	S1	S2	S3	S4	S5	I6	I7	I8	SV9	SV10	
<i>Aspergillus</i>	1	1	2	-	3	1	-	1	1	2	12
<i>Trichoderma</i>	1	4	3	2	2	1	1	2	2	3	21
<i>Fusarium</i>	1	1	1	-	-	-	1	1	1	1	7
<i>Phoma</i>	-	1	1	1	-	1	-	-	2	6	
<i>Penicillium</i>	-	3	4	2	3	4	1	3	3	1	24
<i>Cephalosporium</i>	-	-	-	-	-	1	1	1	-	-	3
<i>NSF</i>	5	4	1	3	3	6	6	4	3	1	36
<i>Curvularia</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Helminthosporium</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1	
<i>Aureobasidium</i>	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>Cladosporium</i>	-	3	2	-	-	1	1	1	2	1	11
<i>Alternaria</i>	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	2
<i>Paecilomyces</i>	2	-	1	-	-	-	-	-	1	-	4
<i>Mucor</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	1
<i>Chaetomium</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>Geotrichum</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1
<i>Nigrospora</i>	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1
<i>Epicoccum</i>	1	-	1	1	1	-	-	1	-	-	5
<i>Neurospora</i>	1	-	-	1	1	-	-	1	1	1	6

Helminthosporium, *Aureobasidium*, *Alternaria*, *Paecilomyces*, *Mucor* and *Nigrospora*.

Considering the distribution of the fungi in SVI and according to climatic seasons (Table 5), one can infer that from the 18 genera isolated, 14 were in Spring, 5 in Summer, 13 in Autumn and 8 in Winter.

The highest frequencies were obtained by *Trichoderma* (Spring), *Neurospora* (Summer), NSF and *Penicillium* (Autumn) and *Phoma* (Winter).

The following genera of fungi were isolated in all climatic seasons: *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* and *Cladosporium*, besides NSF.

In Bertioga beaches 18 genera of fungi were isolated, 9 in Spring, 5 in Summer, 4 in Autumn and 7 in Winter (Table 5). Maximum frequencies were obtained by NSF and *Epicoccum* in Spring, NSF and *Trichoderma* in Summer and by *Aspergillus* in Autumn and Winter.

The NSF and the genera *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* and *Cladosporium* were isolated in all climatic seasons, like those of SVI.

Discussion

The study of molds in the sea water is based on the knowledge that coastal waters suffer the environmental effects of coastal lands. In SVI, this phenomenon is established with greater intensity because the rivers flow through the coastal plain, to the sea, directly or indirectly in artificial channels, suffering the influence of the tide system and establishing on a permanent basis an interchange of marine and fluvial elements.

Therefore, on Smith's (11) classification, the marine habitat of the studied region is included as a typical standard of estuary, where seasonal saline variation predominates according to the tides.

The study of the ecosystems of SVI and Bertioga beaches allows us to draw a parallel between fungal conditions of the polluted and non polluted beaches.

The almost total absence of information about molds incidence in sea water constitutes a gap that must be stopped.

There are no standard techniques for qualitative and quantitative fungal analysis in this substrate deserving a special attention from all researchers.

The genera of fungi that presented a major adaptation to SVI sea were: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* (Table 3).

Still, one must emphasize the dissemination and the high frequency of the NSF (36%) as well as the isolation of *Alternaria*, a fungus of a great allergological importance.

As regards Bertioga, it should be pointed out that the genus *Aspergillus* obtained

Table 4 - Frequencies of the genera of molds isolated at different sampling stations of Bertioga beaches*.

Symbols: * samples from each station
Totaling 81 samples.

Genera	Sampling stations								F	%
	E1	E2	E3	SL4	SL5	G6	G7	G8		
<i>Aspergillus</i>	3	1	2	3	2	2	2	3	1	19
<i>Trichoderma</i>	2	1	1	-	-	3	-	2	1	10
<i>Fusarium</i>	-	-	-	-	-	-	-	2	2	2.5
<i>Phoma</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	1.2
<i>Penicillium</i>	-	2	-	4	2	1	-	2	1	12
<i>Cephalosporium</i>	-	1	1	-	-	-	1	-	1	4
NSF	3	1	2	1	3	1	3	3	4	21
<i>Curvularia</i>	-	-	-	-	-	-	1	-	-	1.2
<i>Cladosporium</i>	-	-	-	3	3	1	1	2	1	12
<i>Chaetomium</i>	-	-	-	-	1	-	-	-	1	1.2
<i>Geotrichum</i>	-	-	-	-	-	1	-	-	1	2.5
<i>Epicoccum</i>	-	1	-	-	2	2	2	1	-	8
<i>Neurospora</i>	-	-	1	1	-	1	-	-	3	3.7

Table 5 - Seasonal variation of the genera of molds isolated in the sea waters of São Vicente Island and Bertioga (relative frequency).

Symbols: SV = São Vicente Island; BE = Bertioga.

Genera	Climatic seasons							
	Spring				Summer			
	sampling stations/numbers of samples		Autumn		Winter			
	SV/30	BE/27	SV/10	BE/9	SV/30	BE/18	SV/30	BE/27
<i>Aspergillus</i>	13.3	7.4	10.0	11.1	16.7	33.3	6.7	37.0
<i>Trichoderma</i>	26.7	18.5	10.0	22.2	20.0	5.5	16.7	7.4
<i>Fusarium</i>	3.3	3.7	-	-	16.7	-	3.3	3.7
<i>Phoma</i>	10.0	-	-	-	6.7	-	36.7	3.7
<i>Penicillium</i>	13.3	14.8	20.0	11.1	23.3	-	3.3	25.9
<i>Cephalosporium</i>	3.3	7.4	-	-	3.3	-	-	7.4
NSF	23.3	40.7	10.0	22.2	73.3	11.1	20.0	22.2
<i>Curvularia</i>	-	-	-	-	3.3	5.5	-	-
<i>Helminthosporium</i>	-	-	-	-	3.3	-	-	-
<i>Aureobasidium</i>	-	-	-	-	3.3	-	3.3	-
<i>Cladosporium</i>	20.0	7.4	20.0	22.2	3.3	22.2	6.7	14.8
<i>Alternaria</i>	3.3	-	-	-	3.3	-	-	-
<i>Paecilomyces</i>	6.7	-	-	-	-	-	3.3	-
<i>Mucor</i>	3.3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Chaetomium</i>	3.3	-	-	-	5.5	-	-	-
<i>Geotrichum</i>	3.3	7.4	-	-	-	-	-	-
<i>Nigrospora</i>	3.3	-	-	-	-	-	-	-
<i>Epicoccum</i>	16.7	25.9	-	11.1	-	-	-	-
<i>Neurospora</i>	-	3.7	60.0	-	11.1	-	-	-

In SVI, this phenomenon is established with greater intensity because the rivers flow through the coastal plain, to the sea, directly or indirectly in artificial channels, suffering the influence of the tide system and establishing on a permanent basis an interchange of marine and fluvial elements.

Therefore, on Smith's (11) classification, the marine habitat of the studied region is included as a typical standard of estuary, where seasonal saline variation predominates according to the tides.

The study of the ecosystems of SVI and Bertioga beaches allows us to draw a parallel between fungal conditions of the polluted and non polluted beaches.

The almost total absence of information about molds incidence in sea water constitutes a gap that must be stopped.

There are no standard techniques for qualitative and quantitative fungal analysis in this substrate deserving a special attention from all researchers.

The genera of fungi that presented a major adaptation to SVI sea were: *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Cladosporium* (Table 3).

Still, one must emphasize the dissemination and the high frequency of the NSF (36%) as well as the isolation of *Alternaria*, a fungus of a great allergological importance.

As regards Bertioga, it should be pointed out that the genus *Aspergillus* obtained

higher frequencies (23.4%) (Table 4) than SVI (12%) (Table 3). So, it seems that in non polluted waters, this genus increases its relative frequency and the opposite occurs with *Penicillium* (Table 3 and 4).

One must emphasize the dissemination of the NSF through the sampling points but with a lower frequency (25.9%) (Table 4) regarding that of SVI (36%) (Table 3).

Therefore, in SVI highly polluted beaches, one can observe a major frequency of the NSF besides the isolation of 6 genera of fungi more than the usual ones (Tables 3 and 4) than in Bertioga beaches.

According to these data it seems there is a factor(s) which contributes to increase the NSF in polluted waters.

From this point of view one must emphasize, by analogy, the work of Simard (10) that verified the increasing of yeasts population in the waters of São Lourenço River (Canada) after a degradation of organic compounds proceeding from sewers.

Based on Table 5, Figure 3 shows the NSF isolated from the waters of SVI beaches attained a maximum frequency in Autumn and a minimum in Summer exactly the opposite to what happened to the sporulated fungi which had a maximum frequency in Summer and a minimum in Autumn.

On the other hand, if one analyzes the isolated fungi of the waters of Bertioga beaches, one shall see that the NSF reached a maximum frequency in Spring and a minimum in Autumn and the sporulated fungi presented a minimum in Spring and an approximate equivalence in Summer, Autumn and Winter.

The fact that firstly draws our attention, when analysing the referred data is the counter position in Autumn, from the maximum apex of the NSF in SVI waters and from the minimum in Bertioga waters (Figure 3).

Through this fact, one can infer the existence of particular factor(s) to the major incidence of the NSF in the polluted waters of SVI beaches.

In the same figure, one can see that in Bertioga there were no remarkable variations in the sporulated fungi frequencies, demonstrating that in non polluted waters, in thesis, there are no major alterations in the qualitative composition of them.

Still regarding the existing sporulated fungi in SVI sea water, the obtained frequencies in Spring, Autumn and Winter were about the same, increasing in Summer.

As regards this piece of information, one must consider the shortage of samples in this climatic season (Table 5).

Through Pearson's calculation of correlation for the analysis of the sporulated fungi, in relation to the number of obtained coliforms of the same samples, one obtained the following value $R = -0.38 \pm 0.28$ which translates a negative correlation, imperfect, considerable and statistically non significant.

Through these coliform index given by the CETESB (State Agency of Basic Sanitation), one obtained on Figure 4, where the NSF frequencies are associated with the number of coliforms in the course of the seasons.

One can clearly observe, the parallelism of the results indicating the coexistence of the NSF and coliforms increasing in SVI waters during Autumn.

The calculation of the statistic correlation provides the value of $R = 0.98 \pm 0.01$, which indicates the positive correlation, imperfect and accentuated, being statistically significant.

Regarding Bertioga's levels of coliforms, one can observe that they were extremely low (17 in Spring, 75 in Summer, 56 in Autumn and 228 in Winter) being that place considered as a good one for sea-bathing.

Through the comparison of the NSF and coliforms levels of Bertioga, the calculation of the correlation was obtained the value of $R = 0.53 \pm 0.24$, which indicates a positive correlation imperfect, accentuated and statistically non significant.

Relating the index of sporulated fungi and coliforms of this region the calculation of correlation gave us the following value $R = 0.42 \pm 0.28$, which indicates an imperfect negative correlation, considerable and statistically non significant.

Therefore, it would be necessary to perform a great number of similar observations in order to state that the NSF could be used as a microbiological indicator in sea water estuaries.

Acknowledgements

The authors wish to thank CETESB and Dr. Maria Therezinha Martins, for the water-samples and information concerning the beaches of "Baixada Santista".

References

1. Agarwal, M.K., Shrivpuri, D.N. & Mukherji, K.G. - Studies on the allergenic fungi spores of the Delhi, India, metropolitan area. *J. Allergy*, 44:193-203, 1969.
2. Alvarez, J.C. & Castro, J.F. - Quantitative studies of airborne fungi of Havana in each of the twenty four hours of the day. *J. Allergy*, 23:259-264, 1952.
3. American Public Health Association. Standard methods for the Examination of Water and Wastewater. 14th edition. New York, 1975.
4. Blackley, C.H. - Experimental researches on the causes and nature of *Catarrhus aestivus*. London, Ballière-Tindal & Cox. London, Dawson's Pall Mall, 1959.
5. Cueva, J., Vertig, M.C., Castillo, V. & Juarez, A.X. - Hongos atmosféricos de la ciudad de Pachuca, Hidalgo, Mexico. *Alergía (Mex.)*, 8:113-118, 1961.
6. Gambale, W., Purchio, A. & Croce, J. - Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 8(3):74-79, 1977.
7. Hopkins, J.G., Benham, R.W. & Kesten, B.M. - Asthma due to a fungus *Alternaria*. *J. Amer. Med. Assoc.*, 94:6, 1930.
8. Lacaz, C.S., Mendes, E., Pinto, R.J.R., Cardoso, T. & Luchetti, L.C.H. - Fungos anemófilos das cidades de São Paulo e Santos (Brasil). *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 13:187-193, 1958.
9. Morrow, M.B., Meyer, G.H. & Prince, H.E. - A summary of airborne mold surveys. *Ann. Allergy*, 22:575-587, 1964.
10. Ordman, D. & Etter, K.G. - The airborne fungi in Johannesburg, S. Afric. *Med. J.*, 30:1054, 1956.
11. Requejo, H.V. - Microflora atmosférica de la ciudad de Trujillo (Peru). III. Generos aislados durante el año de 1971. *Mycopathologia (Den Haag)*, 56:15-20, 1975.
12. Salvaggio, J., Seabury, J. & Schoenhardt, E.A. - New Orleans asthma. V. Relationship between charity Hospital Asthma admission rates, semi quantitative pollens and fungal spore counts and total particulate aerometric sampling data. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 48:96-114, 1971.
13. Santos, E.O. - Características climáticas. In A Baixada Santista: aspectos geográficos. São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras/EDUSP, v. I, pp. 95-150, 1965.
14. Simard, R.E. - Yeasts as an indicator of pollution. *Mar. Pollut. Bull.*, 2:123-125, 1971.

MICOTOXINAS (AFLATOXINAS; PATULINA, OCHRATOXINA A E ESTERIGMATOCISTINA) E CORRESPONDENTES FUNGOS MICOTOXIGÊNICOS EM RAÇÃOES DESTINADAS AO GADO LEITEIRO

Adhemar Purchio

Walderez Gambale

Claudete Rodrigues Paula

Wagner Barbieri

Dept. de Microbiologia ICBUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508 São Paulo SP, Brasil

Myrna Sabino

Instituto Adolfo Lutz

Mario C. A. Meireles

Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Pelotas

& S. Iida

Cooperativa Central de Laticínios do Vale do Paraíba

Summary

Survey of mycotoxins (aflatoxins, patulin, ochratoxin and sterigmatocystin) and correlate fungi in dairy cattle feedstuffs

One hundred and seventy samples of different feedstuffs collected from two different regions of Brasil (Rio Grande do Sul state - RS and São Paulo state - SP) were tested for mycotoxins, aflatoxin producing fungi and other contaminants (molds). Milk samples were obtained from animals fed with analysed toxic meals in order to study the Aflatoxin M 1 content. Aflatoxin B 1 and G 1 were detected in 17 feedstuffs with concentrations among 40 to 200 µg/Kg (B-1) and 10 to 75 µg/Kg (G-1). The humidity rate of the toxigenic meals varied from 9,6 to 24,8% and the highest levels of Aflatoxin B-1 were recovered from those with more than 11,5%. Aflatoxin M-1 was present in 9 samples which presented concentrations among 0,1 µg/Kg to 1,68 µg/Kg. It was not possible to isolate any other mycotoxin. There were isolated different genera of fungi including 17 in RS and 10 in SP samples with recovery of 34,3% and 10% of toxigenic *Aspergillus*, respectively.

Resumo

A presença de fungos contaminantes toxigênicos ou não, bem como de diferentes micotoxinas foram estudados em 170 amostras de ração provenientes de 2 regiões brasileiras (Pelotas, no Rio Grande do Sul (RS) e Vale do Paraíba, Estado de São Paulo (SP)). Aflatoxinas B-1 e G-1 foram encontradas em 17 amostras de reações em concentrações que variaram de 40 a 200 µg/Kg (B-1) e 10 a 75 µg/Kg (G-1). A umidade existente nesses substratos alimentares variou entre 9,6 a 24,8% e maiores índices de aflatoxina foram encontrados em rações que continham teor de umidade acima de 11,5%.

Nove amostras de leite dos animais alimentados com as rações tóxicas revelaram positividade à Aflatoxina M-1 em concentrações de 0,1 µg/Kg a 1,68 µg/Kg. Nas amostras de rações provenientes do RS e de SP isolaram-se 17 e 10 gêneros de fungos contaminantes, bem como 34,3% e 10%, respectivamente de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas. A metodologia utilizada não revelou a presença de outras micotoxinas.

Introdução

A necessidade de manutenção de determinadas espécies de animais em confinamento, provocou aumento considerável na incidência de distúrbios fisiometabólicos, assim como de doenças infecciosas, parasitárias e carenciais. Alterações metabólicas podem ainda ocorrer quando o alimento destinado aos animais sofre contaminação por agentes biotóxicos, originando as chamadas micotoxicoses (5) e ainda, como no caso de Aflatoxina M, a eliminação deste princípio tóxico bio-transformado no leite (3, 4, 7). Graças à sua composição nutritiva, as rações constituem excelente meio para colonização e multiplicação dos fungos, na dependência do teor de umidade apresentado.

O poder toxígeno intrínseco das micotoxinas nesses substratos apresenta, em decorrência, ação lesiva para a saúde humana e animal e portanto, os objetivos imediatos desta investigação foram o isolamento e a identificação de fungos produtores de micotoxinas, bem como a ocorrência de aflatoxinas, patulina, ochratoxina A e esterigmatocistina, em rações destinadas ao gado leiteiro. Paralelamente, avaliou-se a influência do teor de umidade existente nas rações na frequência dos fungos e respectivas micotoxinas, no período de 1 ano, em duas regiões brasileiras localizadas nos Estados de São Paulo (Vale do Paraíba) e Rio Grande do Sul (Pelotas).

Material e Métodos

A região do "Vale do Paraíba" constitui-se numa das principais zonas leiteiras do Estado de São Paulo, Brasil. Amostras de rações (100) constituídas, em geral, de farelos de algodão, de trigo, de milho, de soja e/ou de amendoim, foram coletadas de diversas fazendas localizadas em diferentes municípios desta região. Foram igualmente analisadas, amostras de leite provenientes de animais alimentados com rações que continham aflatoxinas, com vistas à possível detecção de aflatoxina M1.

Em paralelo, foram analisadas 70 amostras de rações provenientes de duas fábricas localizadas na região de Pelotas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, cujos resultados referentes ao isolamento de fungos toxigênicos foram cotejados com informações oriundas do Instituto Meteorológico da Universidade Federal de Pelotas (RS).

Caracterização de Aflatoxinas, Ochratoxina A e Esterigmatocistina - De acordo com Vorster (8), as amostras (50 g) foram extraídas com 200 ml de clorofórmio-metanol-hexano (8+2+1). Após concentração, os extratos foram submetidos à cromatografia em camada delgada (TLC) e as placas foram preparadas conforme técnica da AOAC¹.

A cromatografia para ochratoxina e esterigmatocistina foi desenvolvida com tolueno-acetato de etila e 90% de ácido fórmico (5+4+1). Após a visualização da mancha fluorescente sob luz ultra-violeta de ondas longas a região correspondente foi pulverizada com 20% de solução de hidróxido de potássio para observação de eventual transformação da tonalidade fluorescente. Cromatogramas para pesquisa de Aflatoxinas foram desenvolvidos com clorofórmio-metanol (95+5) ou clorofórmio-acetona (90+10). A análise quantitativa foi realizada pelo método da extinção.

Caracterização da Patulina - O procedimento foi o mesmo descrito por Pohland &

Allen (6). As amostras foram extraídas com clorofórmio, concentradas a vácuo e submetidas à cromatografia em camada delgada (TLC) usando benzeno-metanol-ácido acético (90+5+5) como sistema de solvente e teste de confirmação com pulverização de solução de fenilhidrazina.

Caracterização da Aflatoxina M-1 - O método empregado é conhecido como método CB¹. Amostras de leite foram tratadas com metanol, hexano e solução de clorofórmio adicionada de 4% de NaOH. Os extratos obtidos foram submetidos à cromatografia bidimensional usando éter-metanol-água (95+4+1) e isopropanol + acetona + clorofórmio (6+10+84) como 1º e 2º sistemas de solvente. As amostras que apresentaram 0,1 µg/Kg foram re-analisadas utilizando densitômetro Zeiss adaptado a um espectrofotômetro Zeiss mod PMQ II na região U.V. (360 nm) com emissão secundária para 400-455 nm.

Isolamento e identificação dos fungos - Caracterização dos fungos toxigênicos - Os fungos foram isolados em ágar Sabouraud acrescido de cloranfenicol (100µg/ml) e identificados pela técnica micológica usual. Aqueles considerados prováveis produtores de aflatoxina foram cultivados em meio Sabouraud líquido ou meio de YES (2). Após prazo conveniente de incubação, extraiu-se o filtrado do cultivo com 3 porções de 25 ml de clorofórmio e procedeu-se à cromatografia em camada delgada, após concentração dos extractos a vácuo a um volume final de 5 ml.

Resultados e Discussão

Foram isolados 17 gêneros de fungos das rações provenientes das fábricas situadas no Estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil, incluindo 34,3% de *Aspergillus* toxigênicos. Na região estudada no Estado de São Paulo, isolou-se 10 diferentes gêneros que incluiram 10% de *Aspergillus* toxigênicos. Assinale-se que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram os mais frequentes nas amostras do Rio Grande do Sul. Em São Paulo, o gênero *Penicillium* spp foi prevalente seguido de *Mucor* spp e *Aspergillus* spp (Tabela 1). Demonstrou-se que 24 amostras de rações isentas de aflatoxinas apresentavam-se contaminadas por *Aspergillus* produtores de aflatoxina. É de se notar que os *Aspergillus* toxigênicos foram prevalentes na primavera e outono (Tabela 2). A maior incidência de *Aspergillus* toxigênicos nas rações do Rio Grande do Sul foi demonstrada em rações que apresentavam 9-14% de umidade o mesmo ocorrendo em São Paulo, onde os parâmetros foram de 10-14% (Tabela 3).

Aflatoxina foi detectada em 17 das 170 amostras estudadas (16 em São Paulo e 1 no Rio Grande do Sul). Com referência a outras micotoxinas somente uma amostra revelou esterigmatocistina em concentração muito baixa não se conseguindo confirmar sua presença. O nível de aflatoxinas variou entre 40 a 200 µg/Kg para B-1 e 10 a 75 µg/Kg para G-1. Os níveis de umidade dos alimentos contaminados variaram de 9,6 a 24,8% e concentrações máximas de aflatoxina B-1 foram recuperadas daqueles que apresentavam teor de umidade acima de 11,5%. De 17 alimentos contaminados isolou-se três amostras de Aflatoxina (Tabela 4).

Foram analisadas 50 amostras de leite obtidas de vacas alimentadas com rações que

Tabela 1 - Fungos saprófitas e toxigênicos isolados de 140 amostras de rações em regiões brasileiras.

Símbolos: (1) Frequência relativa (%); (2) Número de colônias; (*) Produtores de aflatoxinas; Frequência relativa (%) = Número de vezes que certos gêneros foram isolados, relativamente ao número de amostras.

Fungo	Rio Grande do Sul (1)	Rio Grande do Sul (2)	São Paulo (1)	São Paulo (2)
<i>Geotrichum</i>			8,0	419
<i>Cephalosporium</i>			15,0	62
<i>Cladosporium</i>	18,6	22	6,0	66
<i>Rhizopus</i>	18,6	39	17,0	51
<i>Mucor</i>	8,6	28	28,0	148
<i>Cunninghamella</i>	1,4	2		
<i>Pleospora</i>	1,4	2		
<i>Trichoderma</i>	2,8	3	5,0	31
<i>Fusarium</i>	2,8	38		
<i>Monascus</i>	1,4	2		
<i>Circinella</i>	4,3	6		
<i>Syncephalastrum</i>	4,3	27	2,0	2
<i>Mycelia sterilia</i>	5,7	5		
<i>Epicoccum</i>	5,7	6		
<i>Aureobasidium</i>	1,4	1		
<i>Paecilomyces</i>	1,4	10		
<i>Alternaria</i>	1,4	1		
<i>Absidia</i>	-	-	2,0	9
<i>Aspergillus</i>	52,9	195	22,0	258
<i>Penicillium</i>	80,0	68	29,0	314
<i>Aspergillus</i> (*)	34,3	102	10,0	26

continham aflatoxinas, tendo-se encontrado M-1 em 9 delas. As seguintes concentrações foram detectadas: 0,1 µg/Kg (4 amostras), 0,18 µg/Kg (2 amostras), 0,56 µg/Kg (1 amostra), 0,74 µg/Kg (1 amostra) e 1,68 µg/Kg (1 amostra). (7).

Tabela 2 - Informações climáticas e distribuição sazonal de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas isolados de rações do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil.

Símbolos: * Média.

	Informações gerais	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Número de amostras	10	20	20	20	
Umidade* (%)	12,5	14,6	10	11,7	
Umidade do ar* (%)	78,5	84,3	83,8	82,2	
Temperatura* (%)	19,4	23,9	20,7	12	
Índice pluviométrico	105	168,6	23,5	90,5	
Freq. de <i>Aspergillus</i> (%)	55	10	40	20	

Tabela 3 - Distribuição das frequências de isolamento de *Aspergillus* spp produtores e não produtores de aflatoxinas segundo o teor de umidade das rações analisadas e provenientes dos estados do Rio Grande do Sul e de São Paulo.

Símbolos: (1) Número de amostras analisadas; (2) Frequência de *Aspergillus*; (3) Frequência de *Aspergillus* produtores de aflatoxinas; a = Estado do Rio Grande do Sul; b = Estado de São Paulo.

Umidade (%)	Rio Grande do Sul (1)	São Paulo (2)	Rio Grande do Sul (3)	São Paulo (1)	São Paulo (2)	Rio Grande do Sul (3)
4-5	-	-	-	2	0	0
5-6	-	-	-	4	0	0
6-7	1	100,0	0	2	0	0
7-8	2	0	0	1	0	0
8-9	5	40,0	20	5	40,0	0
9-10	16	18,8	12,5	5	40,0	0
10-11	12	83,3	75,0	12	16,7	8,3
11-12	1	0	0	12	33,3	11,7
12-13	7	57,1	28,6	14	28,6	14,3
13-14	10	60,0	30,0	10	20,0	30,0
14-15	2	50,0	50,0	7	28,6	0
15-16	4	50,0	25,0	6	0	0
16-17	4	100,0	50,0	5	40,0	20,0
17-18	2	100,0	100,0	2	0	0
18-19	3	66,7	33,3	2	0	0
19-20	-	-	-	3	66,7	33,3
20-21	-	-	-	2	0	0
21-22	-	-	-	2	0	0
22-23	-	-	-	2	0	0
23-24	-	-	-	1	0	0
24-25	-	-	-	1	0	0
32-33		0	0	100		

Agradecimentos

Trabalho realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Proc. nº 80-05.231.

Referências Bibliográficas

- AOAC - Official Methods of Analysis, 12ª. ed., 1975, 1094 pp.
- Davis, N.D.; Diener, V.L.; Eldridge, D.W. - Production of aflatoxin B1 and G1 by *Aspergillus flavus* in a semisynthetic medium. Appl. Microbiol., 14:378-80, 1966.
- Kiermeier, F. - Aflatoxin residues in fluid milk. Pure Appl. Chem., Londo,

- 35:271-3, 1973.
4. Moreau, C. - Les mycotoxines dans les produits laitiers, - Lait, Paris (555-5556):286-303, 1976.
 5. Pier, A.C. - Mycotoxins and Animal Health. Adv. Vet. Sci. Camp. Med., 25:185-242, 1981.
 6. Pohland, A.E. & Allen, R. - Analysis and chemical confirmation of Patulin in grains. Journal of the AOAC, 686-7, 1970.
 7. Sabino, M. - Aflatoxina "M" no leite de vaca comercializado no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 1983.
 8. Vorster, L.J. - A method from the analysis of cereals and groundnuts for three mycotoxins. Analyst, 94:136-42, 1969.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPOSTO 5, 7, 2', 5' -
TETRAACETOXI-4-FENILCUMARINA OBTIDO A PARTIR DE COUTAREA HEXANDRA
(RUBIACEAE)**

Clídenor Cândido de Araújo
Marçal de Queiroz Paula
Ricardo Fernandes Maia
& Edeltrudes de Oliveira Lima

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Universidade Federal de Paraíba
Campus Universitário
58059 João Pessoa PB, Brasil

Resumo

As cascas do caule da *Coutarea hexandra* Schum (Rubiaceae), são largamente utilizadas na medicina popular nos processos inflamatórios. Neste trabalho, foi avaliada a atividade antifúngica e antibacteriana do extrato metanólico dessas cascas e de um derivado da celotenina (I), que é componente instável, isolado do referido extrato. O extrato metanólico e o derivado 5, 7, 2', 5' -tetraacetoxi-4-fenilcumarina (II), em diversas concentrações, foram submetidos a testes "in vitro" frente a quatro fungos e três bactérias. O derivado estável 2 inibiu totalmente todos os microrganismos até a concentração de 25,0 µg/ml, com exceção de *Candida albicans*, com 100,0 µg/ml.

Summary

*Antimicrobial activity evaluation of 5, 7, 2', 5' -
tetraacetoxi-4-phenylcoumarin*

The stem bark of *Coutarea hexandra* Schum (Rubiaceae) is extensively employed in the folk medicine, as an antiinflammatory agent. In the present work, the anti-bacterial and anti-fungal activities of the methanolic extract and a stable derivative of celotenine (I) isolated from the extract were studied against three types of bacteria and four types of fungi. The stable derivative 5, 7, 2', 5' -tetraacetoxi-4-phenylcoumarin (II) totally inhibited the growth of all the bacteria in concentration of 25,0 µg/ml while *Candida albicans* was inhibited at a concentration of 100,0 µg/ml.

Introdução

Coutarea hexandra Schum (Rubiaceae), popularmente conhecida como quina-quina, quina-de-pernambuco e quina-do-brasil, é uma planta nativa das Américas Central e do Sul, difundida em todo território brasileiro. As cascas do caule dessa planta são sucedâneas das verdadeiras quinas no tratamento da malária (5), além de possuirem propriedades antidiabéticas (4) e serem utilizadas nos tratamentos de doenças inflamatórias pela medicina popular.

O extrato metanólico das cascas do caule de *C. hexandra* forneceu uma substância 4-arylumarínica (3) instável, denominada Celotenina (I), cujo derivado 5, 7, 2', 5' -tetraacetoxi-4-fenilcumarina (II) apresentou acentuado efeito broncodilatador

(1, 2). Agora, o extrato metanólico dessas cascas e o composto II, foram submetidos a testes "in vitro" para verificar atividade antimicrobiana, incluindo fungos leveduriformes e filamentosos e bactérias.

Material e Métodos

1) O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia, utilizando-se vidraria e equipamentos rotineiros.

2) O extrato metanólico das cascas do caule de *C. hexandra* e o composto 5, 7, 2', 5' -tetraacetoxi-4-fenilcumarina (2), foram obtidos no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Universidade Federal da Paraíba. O extrato metanólico foi testado nas concentrações de 500,0 e 250,0 µg/ml; o composto 5, 7, 2', 5 -tetraacetoxi-4-fenilcumarina foi ensaiado a 100,00, 50,0, 25,0, 12,5, 6,2 e 3,1 µg/ml, solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO).

3) Os meios de cultura usados para os ensaios com fungos e bactérias, respectivamente, foram Caldo Sabouraud e Nutritivo. (Difco).

4) Foram usados nos testes microbiológicos: *Candida albicans* (FCF-243), *Cryptococcus neoformans* (FCF-119), *Trichophyton rubrum* (FCF-249), *Microsporum canis* (FCF-258), *Staphylococcus aureus* (ATCC-29737), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC-12228), *Bordetella bronchiseptica* (ATCC-4617), obtidas da micoteca da Seção de Micologia e Parasitologia Clínicas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e Instituto de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

5) Metodologia: Os ensaios microbiológicos foram realizados pelo método das diluições em meios líquidos. Em uma bateria de tubos de ensaio, contendo o 1º tubo, 6 ml de meio líquido e compostos solubilizados, obteve-se as concentrações iniciais de 500,0 e 100,0 µg/ml. Partindo-se destas concentrações, foram feitas as diluições seriadas. Em seguida, foi adicionado o inóculo de 0,1 ml das suspensões leveduriformes e bacterianas. Estas suspensões foram preparadas, respectivamente, em água destilada e solução salina esterilizada, a partir de culturas jovens (48 horas), sendo padronizadas através da escala de MacFarland (tubo nº 3). Nos ensaios com fungos filamentosos, foi adicionado um fragmento da colônia repicada 14 dias antes dos ensaios. Foram feitos controles para os microrganismos e o solvente. As condições para incubação foram: 48 horas e 37°C para os ensaios com leveduras e bactérias e 7-14 dias à temperatura ambiente (28-30°C) para os ensaios com fungos filamentosos.

Após as leituras dos resultados, foi determinada a concentração fungicida e bactericida mínima (CFM e CBM), em meio sólido inclinado, com relação às concentrações do composto que exerceram inibição total sobre os fungos e as bactérias.

Resultados

Decorrido o período de incubação, foram lidos os resultados em função da ausência ou presença de turbidez, relacionados com a atividade do composto. Estes resultados foram confirmados pela leitura espectrofotométrica (Tabela 1).

Discussão

Mediante as informações obtidas na literatura científica com relação às atividades medicinais de *C. hexandra*, realizamos o trabalho para avaliar sua atividade antifúngica e antibacteriana. Nos ensaios microbiológicos "in vitro", foram utilizados o extrato metanólico das cascas do caule nas concentrações 500,0 e 250,0 µg/ml; e o composto 5, 7, 2', 5' -tetraacetoxi-4-fenilcumarina a 100,0, 50,0, 25,0, 15,5, 6,2 e 3,1 µg/ml. O extrato metanólico, na concentração de 500,0 µg/ml apresentou atividade sobre microrganismos, com exceção da *C. albicans*. O composto II na concentração de 12,5 µg/ml causou inibição completa sobre *S. epidermidis*, e a

25,0 µg/ml foi ativo sobre *C. neoformans*, *T. rubrum*, *M. canis*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *B. bronchiseptica*, conforme Tabela 1. Na determinação da concentração fungicida mínima (CFM), foram observados resultados positivos a 100,0 µg/ml para *C. albicans* e *T. rubrum*, e 50,0 µg/ml para *C. neoformans* e *M. canis*.

Os resultados indicam, portanto, que, tanto o extrato metanólico das cascas do caule de *C. hexandra*, como seu composto isolado 5, 7, 2', 5'-tetraacetoxi-4-fenilcumarina (II) apresentam atividade antimicrobiana, com efeitos fungistático/fungicida e bacteriostático/bactericida. Estes dados representam os primeiros resultados antimicrobianos desta classe de composto.

Tabela 1 - Resultados dos ensaios microbiológicos com o extrato metanólico de cascas do caule de *Coutarea hexandra* e com o composto 5,7,2',5'-tetraacetoxi-4-fenilcumarina em meio líquido.

Símbolos: +++; Excelente inibição; ++: Boa inibição; +: Inibição regular; +: Valor discutido, 0: Crescimento total do microrganismo.

MICROORGANISMO								
Extrato e Composto em µg/ml								
	<i>C. albicans</i>	<i>C. neoformans</i>	<i>T. rubrum</i>	<i>M. canis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>B. bronchiseptica</i>	
Extrato Metanólico	500,0	+++	++++	++++	++++	+++	+++	+++
	250,0	++	+++	++	+	+++	++	++
Composto 5,7,2',5'-tetra- acetoxi-4-fenil- cumarina	100,0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	50,0	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	25,0	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	12,5	++	0	0	++	++	++	++
	6,2	+	0	0	++	++	++	0
	3,1	+	0	0	0	++	++	0
Controle do Microrganismo	0	0	0	0	0	0	0	0
Controle do Solvente (DMSO)	0	0	0	0	0	0	0	0

Referências Bibliográficas

1. Araújo, C.C.; Thomas, G.; Paulo, M.Q. - Efeito broncodilatador do composto (CH-03) Ac da *Coutarea hexandra* Schum (Rubiaceae). IV Congresso Brasileiro de Farmacologia Experimental e Terapêutica. Resumo pág. 283, São Paulo, 1986.
2. Araújo, C.C. - Estudos químicos e farmacológicos da *Coutarea hexandra* Schum. Dissertação de Mestrado. João Pessoa - PB, 1986.
3. Araújo, C.C. & Paulo, M.Q. - Um novo neoflavonóide da *Coutarea hexandra* Schum (Rubiaceae). 38ª Reunião Anual da SBPC. Resumo pág. 588, Curitiba, 1986.
4. Martinez del Campos, I. - Action of *Coutarea hexandra* on normal and diabetic blood-sugar levels. An. Int. Med. México, 8:332, 1906.
5. Peckolt, W. - Contribuição ao estudo das falsas quinas medicinais da América do Sul, Rio de Janeiro. Pimenta e Mello, 201-223, 1916.

PARTICIPAÇÃO DE ROTAVÍRUS E ADENOVÍRUS NA DIARRÉIA AGUDA DA INFÂNCIA, EM BELO HORIZONTE

José Noronha Perez
 Luiz Fernando Lima Reis
 Jaqueline Germano Contijo

Laboratório de Vírus
 Depto de Microbiologia
 Instituto de Ciências Biológicas UFMG
 Av. Antônio Carlos, s/n
 31310 Belo Horizonte MG, Brasil

Dulciene Maria de Magalhães Queiroz
 Edilberto Nogueira Mendes

Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia
 Depto de Clínica Médica
 Faculdade de Medicina UFMG
 Av. Alfredo Balena, 190
 30310 Belo Horizonte MG, Brasil

& Francisco José Penna

Dept de Pediatria
 Faculdade de Medicina UFMG

Resumo

Rotavírus e adenovírus foram pesquisados nas fezes de 152 crianças com diarréia aguda, de até 5 anos de idade, em Belo Horizonte, no período de 1981 a 1985. Os espécimes foram diluídos em solução tamponada e centrifugados. Os sobrenadantes foram usados para a detecção do vírus, empregando-se o método imunoenzimático (EIARA). A pesquisa do Rotavírus foi positiva em 32 crianças (21,05%) e de Adenovírus em 7 (4,60%) tendo sido identificados 2 vírus, simultaneamente, em 3 pacientes. Através de eletroforese em gel de poliacrilamida identificou-se, nas fezes de um paciente com 3 meses de idade, uma amostra de Rotavírus com perfil do grupo C.

Summary

Occurrence of rotavirus and adenovirus in children with acute diarrhoea in Belo Horizonte

Rotavirus and adenovirus were searched for in fecal samples from 152 children with acute diarrhoea, all of them younger than five years, in Belo Horizonte, Brazil, from 1981 to 1985. The fecal samples were stored at -20°C before tested for identification of rotavirus and adenovirus by an enzyme-linked immunoabsorbant assay. Thirty two (21,05%) of 152 samples were positive, for rotavirus, while 7 (4,06%) were positive for adenovirus; and 3 of them for both, rotavirus and adenovirus. Rotavirus with group C-like profiles has been found in a fecal sample from a three months old child.

Introdução

Os vírus são importantes agentes de diarréia aguda infantil, tanto nos países desenvolvidos como nos países em desenvolvimento. A enterite viral ocorre de forma epidêmica ou endêmica e apresenta, como sintomas mais frequentes, além da diarréia, náuseas, vômitos, febre e anorexia, podendo ser fatal em crianças ou adultos debilitados (4, 7). Dentre os agentes causadores desta entidade os Rotavírus, Família Reoviridae, têm sido considerados os mais frequentes (7), com incidências que variam de 20% (1) a 73% (5), enquanto que os Adenovírus aparecem em seguida com uma frequência de, aproximadamente, 5% (1, 9).

Os Rotavírus foram descritos por Bishop & col. (3) que os identificaram, com o emprego do microscópio eletrônico, em fragmentos de duodeno obtidos por biópsia e em amostras de fezes de crianças com diarréia, cuja etiologia não era bacteriana. Estes achados foram confirmados por outros pesquisadores e, desde então, diferentes métodos de diagnóstico têm sido propostos para a identificação destes vírus, como a contraimunoeletroforese (12), a fixação de complemento (11), a hemoaglutinação por imunoaderência (8) e a eletroforese em gel de poliacrilamida de RNA viral (6). Mais recentemente, Pereira & col. (10) propuseram um método imunoenzimático que permite o diagnóstico simultâneo de Rotavírus e Adenovírus (EIARA)..

Neste trabalho, procurou-se determinar a incidência de Rotavírus e Adenovírus em crianças com diarréia aguda em Belo Horizonte, empregando-se o método imunoenzimático do "sandwich" duplo proposto por Pereira & col. (10).

Material e Métodos

Procedência e preparo das amostras de fezes - Foram colhidas amostras de fezes de 152 crianças de até 5 anos, com diarréia aguda, atendidas em ambulatórios (147) ou enfermarias (5) do Hospital das Clínicas -UFMG, Sálvio Nunes e São Domingos Sávio, em Belo Horizonte, no período de 1981 a 1985. As amostras de fezes foram diluídas em salina tamponada (PBS) numa concentração de 20% e centrifugadas a 200 g. por 15 minutos. Os sobrenadantes foram distribuídos em aliquotas e conservados a -20°C.

Ensaios imunoenzimáticos - Para a realização do teste foi utilizado um "kit" gentilmente cedido pelo Dr. H.G. Pereira do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, Brasil, empregando-se a metodologia descrita por Pereira & col (10).

As amostras de Rotavírus SA11 e hexon purificados de Adenovírus eram utilizados como controle positivo. Como controle negativo eram empregadas as mesmas amostras, porém na presença de soro não homólogo. Eram também realizados controles com o conjugado na presença dos soros de captura para revelar possíveis reações falso-positivas e como branco, era utilizado apenas o substrato.

Resultados

Os resultados da Tabela 1 mostram que entre as 152 amostras de fezes examinadas, 32 foram positivas para Rotavírus (21,05%) e 7 para Adenovírus (4,6%). Em 3 delas os 2 vírus foram identificados, simultaneamente.

A distribuição sazonal das infecções por Rotavírus acha-se representada na Figura 1.

Na Tabela 2 apresenta-se a distribuição, de acordo com a faixa etária, das crianças com diarréia aguda causada por Rotavírus e Adenovírus.

As manifestações clínicas mais frequentemente apresentadas pelos pacientes com diarréia causada pelo Rotavírus e Adenovírus encontram-se na Tabela 3.

Nenhum óbito foi registrado nesta casuística.

Tabela 1 - Incidência de rotavírus e adenovírus em 152 crianças com diarréia aguda em Belo Horizonte, no período de 1981 a 1985.

Vírus	Anostras positivas Nº	%
Rotavírus	32	21,05
Adenovírus	7	4,60

Tabela 2 - Distribuição, de acordo com a idade, de crianças com diarréia causada por rotavírus e adenovírus, em Belo Horizonte no período de 1981 a 1985.

Faixa etária (meses)	Testadas	Amostra de fezes	
		Rotavírus (%)	Adenovírus (%)
0 a 3	46	9 (19,5)	3 (6,5)
4 a 6	42	9 (21,5)	2 (4,7)
7 a 12	32	9 (28,1)	2 (6,2)
13 a 18	16	5 (31,2)	0
19 a 26	3	0	0

Tabela 3 - Manifestações clínicas apresentadas por 32 crianças com diarréia aguda causada por rotavírus e/ou adenovírus, em Belo Horizonte, no período de 1981 a 1985.

Manifestações clínicas	Rotavírus		Adenovírus	
	Nº	%	Nº	%
Vômitos	23	71,8	2	28,6
Febre	22	68,7	4	57,1
Desidratação I	8	3		
Desidratação II	16	78,1	2	71,5
Desidratação III	1	0		
Desnutrição I	11	2		
Desnutrição II	2	46,8	1	57,1
Desnutrição III	3	1		
Sintomas Respiratórios	9	28,1	0	

Discussão

Os resultados do presente trabalho, 21,05% de casos positivos para Rotavírus e 4,6% para Adenovírus entéricos, se aproximam dos relatados por Azeredo & col. (1), no Rio de Janeiro. Percentuais mais elevados foram obtidos por outros autores como Baldacci & col. (2) que, em São Paulo, relatam 35,27% de positividade para Rotavírus. Isso provavelmente se deve ao uso de técnicas e reagentes diferentes.

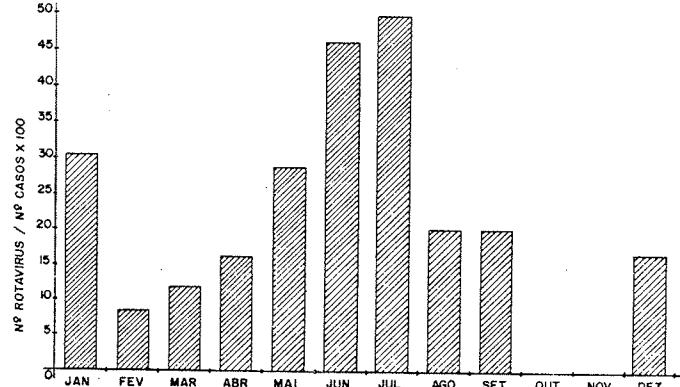
Com relação à incidência dos Rotavírus nas diferentes faixas etárias, verificou-se, pelos dados da Tabela 1, percentuais crescentes a partir de 0 a 3 meses até 18 meses.

Acima desta idade, com relação aos Adenovírus, apenas crianças de 3 a 12 meses foram acometidas.

Cabe salientar a maior incidência da doença nos meses de inverno, o que também ocorre em países de clima temperado como Inglaterra, Austrália e Estados Unidos (7).

Apesar de as crianças estudadas serem de baixo nível sócio-econômico, não houve óbitos e a gravidade da doença foi média, conforme se verifica pelos dados da Tabela 3. Os casos de desidratação e desnutrição do tipo III foram relativamente raros.

Cabe referir que uma amostra procedente de um paciente de 3 meses de idade, cujo resultado foi duvidoso através da reação imuno-enzimática, quando submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida no Instituto Oswaldo Cruz pelo Dr. H.G. Pereira mostrou um perfil igual ao dos atípicos do grupo C. Muitas das suspensões estudadas no presente trabalho foram também examinadas no referido Instituto onde foram confirmados os resultados.



Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. H.G. Pereira que gentilmente cedeu o "kit" utilizado neste trabalho e repetiu alguns experimentos, no Instituto Oswaldo Cruz.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Financiadora de Estudos e Projetos.

Referências Bibliográficas

1. Azeredo, R.S.; Leite, S.P.G.; Pereira, H.G.; Vidal, M.N.P.; Andrade, Z.P.; Farias, V.; Sutmoller, F. & Schatzmayr, H.G. - Agentes virais associados à gastroenterite infantil no Rio de Janeiro, 1º semestre-1983. *Bol. Epidemiol.*, Rio de Janeiro, 15:193-194, 1983.
2. Baldacci, E.R.; Candeias, J.A.N.; Breviglieri, J.C. & Grisi, S.J.E. - Etiologia viral e bacteriana de casos de gastroenterite infantil: uma caracterização clínica. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, 13:47-53, 1979.
3. Bishop, R.F.; Davidson, G.P.; Holmes, I.H. & Ruck, B.J. - Vírus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2:1281-1283, 1973.
4. Cukor, G.; Perron, D.M.; Hudson, R. & Blacklow, N.R. - Detection of rotavirus in human stools by using monoclonal antibody. *J. Clin. Microbiol.*, 19:888-892, 1984.
5. Davidson, G.P.; Goller, I.; Bishop, R.F.; Townley, R.R.W.; Holmes, I.H. & Ruck, B.J. - Immunofluorescence in duodenal mucosa of children with acute enterites due to a new virus. *J. Clin. Pathol.*, 28:263-266, 1975.
6. Espejo, R.; Rometo, P.; Calderón, E. & González, N. - Diagnóstico de rotavirus por electroforesis del RNA viral. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.*, 35:323-331, 1978.
7. Groupe de Travail Scientifique de l'OMS - Diarrhés à rotavirus et autres diarrhées virales. *Bull. O.M.S.*, 58:539-557, 1980.
8. Kapikian, A.Z.; Cline, W.L.; Greenberg, H.B.; Wyatt, R.G.; Kalica, A.R.; Banks, C.E.; James Jr., H.D.; Flores, J. & Chanock, R.M. - Antigenic characterization of human and animal rotaviruses by immune adherence hemagglutination assay (IAHA): evidence for distinctness of IAHA and neutralization antigens. *Infect. Immun.*, 33:415-425, 1981.
9. Leite, J.P.; Pereira, H.G.; Azeredo, R.S. & Schatzmayr, H.G. - Adenoviruses in faeces of children with acute gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med. Virol.*, 15:203-209, 1985.
10. Pereira, H.G.; Azeredo, R.S.; Leite, J.P.; Andrade, Z.P. & de Castro, L.A. - Combined enzyme immunoassay for rotavirus and adenovirus (EIARA). *J. Virol. Methods*, 10:21-28, 1985.
11. Spence, L.; Fauvel, M.; Bouchard, S.; Babiuk, L. & Saunders, J.R. - Test for reovirus-like agent. *Lancet*, 2:322, 1975.
12. Tufvesson, B. & Johnsson, T. - Occurrence of reo-like calf viruses in young children with acute gastroenteritis: diagnosis established by electron microscopy and complement fixation, using the reo-like virus as antigen. *Acta Pathol. Microbiol Scand (Sect B)*, 84:22-28, 1976.

INHIBITORY EFFECT OF HUMAN AMNIOTIC INTERFERON IN FOUR PLANT VIRUS SYSTEMS*

Marly Vicente
Gilda De Fazio

Seção de Virologia Fitopatológica e Fisiopatologia
Instituto Biológico
Caixa Postal 7119
01051 São Paulo SP, Brasil

& Romain Rolland Colgher

Laboratório de Vírus
Deptº de Microbiologia UFMG
Caixa Postal 2486
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

Efeito Inibidor do interferon de amnio humano (Hu Am IFN) sobre quatro vírus de plantas.

O efeito do Hu Am IFN em quatro sistemas vírus-planta foi avaliado usando-se *Datura stramonium* e *Nicotiana glutinosa* para TMV, *Nicotiana tabacum* para TSWV e *Gomphrena globosa* para PVX.

Em todos os sistemas as preparações de Hu Am IFN induziram uma inibição de cerca de 40% sobre o número de lesões locais induzidas pelo vírus. O sistema *G. globosa* X PVX foi selecionado, por conveniência, para a maioria dos experimentos.

Usando-se um intervalo de tempo de 72 horas, entre o tratamento com o IFN e a inoculação do vírus, verificou-se que:

a. baixas concentrações de Hu Am IFN ou de IFN alpha recombinante foram ativas.

b. o estabelecimento do estado antiviral foi impedido por um pré-tratamento com Actinomicina D ou pela termoterapia (incubação das plantas a 32°C).

c. o efeito inibidor do IFN foi revertido pelo anticorpo específico para IFN de leucócito humano.

Esses resultados reforçam a idéia de que os IFNs humanos desencadeiam, nas plantas, um estado antiviral semelhante ao induzido pelos fatores antivirais de plantas.

Summary

The effect of human amniotic interferon (Hu Am IFN) on different plant-virus systems was evaluated using *D. stramonium* and *N. glutinosa* for tobacco mosaic virus (TMV); *G. globosa* for potato virus X (PVX) and *N. tabacum* for tomato spotted wilt virus (TSWV). In all systems, Hu Am IFN preparations induced a reduction above 40% in the number of local lesions in the inoculated leaves.

* Work partially supported by grants from FINEP B-76.81.237.00.00, SAA/IB - 5.4.85.0195.00 and FIPEC.

The system *G. globosa* X PVX was selected for the majority of the experiments for convenience.

Using 72 hours as time interval between IFN treatment and virus inoculation it was shown:

- a. very small concentrations of Hu Am IFN or pure r Hu alpha 2 IFN were active;
- b. the establishment of an antiviral state was prevented by a pre-treatment with AMD or by incubating plants at 32°C;
- c. the inhibitory effect of IFN was reversed by the antibody specific to human leukocyte interferon.

These results reinforces the idea that human IFNs (alpha and beta-like) exert in plants an antiviral activity similar to that induced by plant antiviral factors.

Introduction

In the last few years, many evidences have shown that plants, as well as vertebrates, are endowed with an active defense mechanism induced by viral infection or by some other inducers (8,9,14,16). This mechanism was associated with the appearance of new proteins and is being studied by many research workers (16). On the other hand, a mechanism similar to the interferon (IFN) response in vertebrates was attributed to the release of an antiviral factor (AVF) (already isolated and characterized) (14), or to inhibitors of viral replication (6).

The similarities between AVF and IFN led some authors to study the effect of human IFN on plant viruses. Orchansky et al. (11) have shown that human IFN from leukocytes and fibroblasts could protect tobacco plants against tobacco mosaic virus (TMV) infection and Rosenberg et al. (13) have demonstrated that natural and recombinant human leukocyte IFN inhibit TMV multiplication in tobacco protoplasts. Similarly Vicente et al. (17) recently demonstrated the inhibitory effect of Human Gamma IFN (Hu g IFN) against TMV and Potato Virus X (PVX).

However Antoniw et al. (1) concluded that human IFN had no direct effect on TMV-RNA infectivity, local lesion development and virus multiplication when applied to tobacco plants.

Also Huisman et al. (7) and Loesch-Fries et al. (10) working with alfalfa mosaic virus observed no significant decrease of virus accumulation in isolated protoplasts after treatment with recombinant interferons (alpha and beta).

In this paper evidence is presented that human amniotic (Hu Am) and human recombinant alpha 2 IFN can protect plants against some viral infections. For this protection, similar conditions as for IFN action in vertebrates are required.

Material and Methods

Interferons - Human amniotic interferon (Hu Am IFN) (beta-like) was obtained from amnions infected with Sendai virus, according to Fournier et al. (5). Purification was done by affinity chromatography in Cibacron Blue F3-GA-agarose (4).

Specific activity of crude Hu Am IFN was 300 units per mg of protein and that of the purified product was 3000 units per mg of protein. Mock preparations were obtained by mixing media from amniotic membrane cultures and Sendai virus. Human recombinant alpha 2 (rHu alpha 2) IFN, obtained from Schering Co., was purified to an excess of 10^9 units per mg of protein.

Antibody - The NIH (G-026-502-568) standard antibody for human leukocyte interferon was used.

Plant hosts and viruses - *Datura stramonium* L. and *Nicotiana glutinosa* L. were chosen as local hosts for TMV; *Gomphrena globosa* L., for potato virus X (PVX) and *Nicotiana tabacum* L. "White Burley", for tomato spotted wilt virus (TSWV). TMV inoculum source was a partially purified preparation (0.3 µg/ml). For PVX and TSWV

the inoculum consisted of a crude sap prepared by macerating infected leaves (1:10 w/w) with 0.5% sodium sulphite.

Experimental procedures - Interferons were diluted to 100 international reference units (human fibroblast IFN-NIH G-023-902.527) with phosphate buffer 0.001 M, pH 7 and brushed onto the upper surface of host leaves. In all cases, two leaves per plant were treated, except for *N. tabacum* X TSWV when only one leaf was used. After different time intervals the virus was mechanically inoculated on treated and control plants. Controls received either phosphate buffer or mock IFN preparations with the same protein concentration of the crude Hu Am IFN samples.

For neutralization of IFN activity, r Hu alpha 2 IFN was diluted to 24 IU/ml, mixed with the antibody diluted to 1:750 (equal volumes) and incubated at 37°C for 60 min. The materials were then applied to *G. globosa* leaves and infected with PVX as described above. This dilution of antibody was able to neutralize the antiviral activity of rHu alpha 2 IFN in the VERO-EMC-system more than 99%.

For the experiments with actinomycin D (AMD), plant leaves were brushed with either an aqueous solution of AMD (5 µg/ml) or with distilled water. After one hour the leaves were thoroughly rinsed to remove excess of the antibiotic. Three hours after rinsing, the plants were divided in two groups, one receiving IFN and the other phosphate buffer as control.

To study temperature effect on the reversion of IFN antiviral activity, groups of ten *G. globosa* plants received one Hu Am IFN treatment (by brushing the leaves) and were incubated at 32°C (8 hours photoperiod) with different time intervals as seen in Fig. 1. After 72 hours from the beginning of the experiment all plants were PVX inoculated and transferred to a glasshouse. As controls equal number of plants were brushed with phosphate buffer and submitted to the same treatments.

When controls showed typical symptoms, local lesions were counted and the inhibition percentage (IP) was calculated according to the formula: $IP = 1 - A/B \times 100$ in which A = average number of lesions produced by treated leaves and B = average number of lesions produced by controls.

For each experiment at least six plants were used per treatment and the experiments were repeated at least twice. Tables present the results of one typical experiment.

The results were submitted to statistical analysis.

Results and Discussion

The interval of 72 hours between IFN treatment and virus inoculation was the most suitable when different time intervals were tested using *N. glutinosa* X TMV and *G. globosa* X PVX combinations. Thus, this interval was used in all experiments, unless otherwise stated. In tobacco protoplasts (13) or tobacco leaf discs (11) the protection induced by IFN was reached in shorter time intervals. Since in this paper whole plants were used, it is plausible that the protection kinetics may be different.

The results of Hu Am IFN inhibitory effect in four virus-host systems is shown in

Figure 1 - Effect of the temperature (32°C) on the reversion of the antiviral activity of Hu Am IFN on *G. globosa* x PVX system.

Symbols: IP - inhibition percentage calculated using the average number of local lesions in 12 leaves.

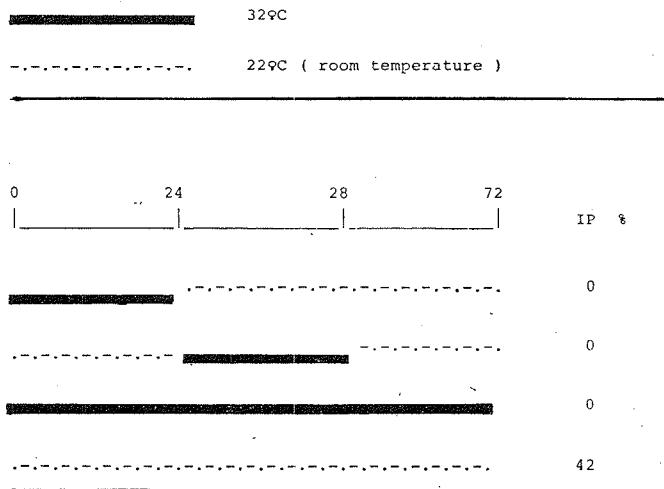


Table 1. Inhibition of virus replication was observed in all systems and similar IPs were obtained, above 40%. These experiments were repeated several times and although local lesion numbers varied in different experiments IP values were consistent. For reasons of convenience further experiments were carried out with *G. globosa* X PVX. Similar results were shown by Orchansky et al. (11) working with human natural beta and recombinant alpha interferons in TMV infected tobacco "Samsun" leaf discs and also by Rosenberg et al. (13) using human natural and recombinant leukocyte IFN in TMV infected tobacco protoplasts. Furthermore Vicente et al. (17) showed that Hu g IFN could significantly decrease the number of local lesions in *G. globosa* x PVX and *D. stramonium* X TMV. However, it must be pointed out that several authors (1,7,10) could not demonstrate protection in infected plant tissues using human interferons. These apparent discrepancies could be due to different degrees of sensitivity to interferon shown in different plant virus host systems as it has been extensively shown in several Vertebrate systems (15).

Table 1 - Inhibition of plant virus by the human amniotic interferon (100 U/ml)^a.
Symbols: a - 72 hours interval between IFN treatment and virus inoculation; b - average number of local lesions / leaf (12 leaves); IP - Inhibition percentage.

Host	Virus	IU ^b		IP%
		Control	IFN	
<i>Datura stramonium</i> L.	Tobacco mosaic virus	68	34	50
<i>Nicotiana glutinosa</i> L.	Tobacco mosaic virus	30	18	40
<i>Nicotiana tabacum</i> L. "White burley"	Tomato spotted wild virus	83	48	42
<i>Gomphrena globosa</i> L.	Potato virus X	51	24	53

Table 2 shows the results of decreasing concentrations of purified Hu Am IFN preparations in comparison with r Hu alpha 2 IFN. Very small IFN concentrations such as 0.0010 U/ml (for r Hu alpha 2 IFN) or 0.00010 U/ml (for partially purified Hu Am IFN) were still active and in both cases induced an IP of 46%. A very intriguing result was the high sensitivity of *G. globosa* leaves to very low dosages of Hu Am IFN or r Hu alpha 2 IFN, much lower than in the homologous human systems. This was also shown in TMV-infected tobacco leaf discs (11) or protoplasts (13). This unusual behaviour deserves to be further investigated.

Table 2 - Effect of human amniotic interferon (IFN) and recombinant human alpha 2 IFN concentrations on PVX inhibition in *G. globosa* leaves^a.
Symbols: a - 72 h interval between IFN treatment and virus inoculation; b - Average number of local lesions/leaf (20 leaves); IP - Inhibition percentage.

The effect of AMD on the establishment of an antiviral state was investigated in *G. globosa* X PVX and in *N. glutinosa* x TMV systems (Table 3). In this case the interval between IFN treatment and virus inoculation was shortened to 24 and 48 hours, for *N. glutinosa* x TMV and *G. globosa* x PVX respectively, due to the possible toxic effects of AMD. A reversion of virus inhibition was observed only in the *N. glutinosa* x TMV system. For *G. globosa* x PVX system this effect could not be observed as a consequence of the shortened time interval between treatment and inoculation. These experiments, using AMD, demonstrated that in plants as well as in Vertebrate systems synthesis of m RNA is crucial (15).

Furthermore, the protective effect of IFN in *G. globosa* was suppressed when the plants were incubated 72 hours at 32°C (Fig. 1).

Treatment	Concentration IU/ml	LU ^b ±SD	IP%
Hu Am IFN Partially purified preparation			
100	27±6.68	66	
1.0	17±9.48	72	
0.010	18±10.40	70	
0.00010	33±9.23	46	
Mock IFN	0	61±16.50	-
Recombinant human alpha 2 IFN			
100	33±7.64	57	
10	37±7.36	51	
1.0	38±11.81	50	
0.10	38±15.90	50	
0.010	45±13.48	41	
0.0010	41±17.59	46	
0.00010	54±11.88	29	
Mock IFN	0	76±16.87	-

Thus, temperature seems to be an indispensable requisite for the development of IFN protection, similarly to what occurs for the appearance of resistance associated proteins (RAPs) (18).

The antiviral effect of r Hu alpha 2 IFN could also be reversed by antibody specific to human leukocyte interferon in the *G.*

globosa x PVX system (Table 4). This

Table 3 - Effect of actinomycin D (AMD) on the reversion of the inhibition induced by human amniotic interferon in two plant-virus systems.

Symbols: a - average number of local lesions/leaf (12 leaves); IP - Inhibition percentage.

Treatment	<i>N. glutinosa</i> x TMV		<i>G. globosa</i> x PVX	
	LL ^a	IP %	LL ^a	IP %
Water - buffer - virus (control)	33	-	67	-
Water - IFN - virus	17	48	51	24
AMD - buffer - virus	29	12	61	9
AMD - IFN - virus	32	0	77	0
Variation coefficient	30.5		22.2	
least significant difference (Tukey 5%)	13.7		23.0	

inhibition and its neutralization by antibody demonstrates that these results are primarily due to IFN molecules.

The results presented in this paper show that plant protection induced by IFNs requires similar conditions to those necessary for IFN action in vertebrate cells and for antiviral factors (AVFs) and RAPs in plants. Thus, as already pointed out by several authors (2, 3, 6, 12, 14), plants and animals exhibit a mechanism of virus resistance which is, in some aspects, very similar.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge E.G. Kroon and C. Gonzaga for the valuable technical assistance.

References

1. Antoniw, J.F.; White, R.F. & Carr, J.P. - An examination of the effect of human alpha interferons on the infection and multiplication of tobacco mosaic virus in tobacco. *Phytopath. Z.* 109:367-371, 1984.
2. Chessin, M. - Is there a plant interferon? *Botan. Rev.* 49:1-28, 1983.
3. Fantes, K.H. & O'Neill, C.F. - Some similarities between a viral inhibitor of plant origin and chick interferon. *Nature* 203:1048-1050, 1964.
4. Ferreira, P.C.P.; Peixoto, M.L.P.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. - Assay of human interferon in Vero cells by several methods - *J. Clin. Microbiol.* 9:471-475, 1979.
5. Fournier, F.; Falcoff, E. & Chany, C. - Demonstration, mass production and characterization of a heavy molecular weight human interferon. *J. Immunol.* 99:1036-1041, 1967.
6. Gera, A. & Loebenstein, G. - Further studies of an inhibitor of virus replication from tobacco mosaic virus-infected protoplasts of a local lesion - responding tobacco cultivar. *Phytopathology* 73:111-115, 1983.
7. Huisman, M.J.; Broxterman, H.J.G.; Schellekens, H.; Van Vloten - Doting, L. - Human interferon does not protect cowpea plant cell protoplasts against infection with alfalfa mosaic virus. *Virology*, 143:622-625, 1985.
8. Kassanis, B. - Some speculations on the nature of the natural defence mechanism of plants against virus infection. *Phytopath. Z.* 102:277-291, 1981.
9. Kassanis, B. - Has the plant a resistance system based on interferon-like proteins? *Phytopath. Z.* 108:185-190, 1983.
10. Loesch-Fries, L.S.; Halk, E.L.; Nelson, S.E. & Krahn, K.J. Human leukocyte interferon does not inhibit alfalfa mosaic virus in protoplasts of tobacco tissue. *Virology* 143:626-629, 1985.
11. Orchansky, P.; Rubinstein, M. & Sela, I. - Human interferons protect plants from

Table 4 - Reversal of the antiviral effect of r Hu alpha 2 IFN by antibody on *G. globosa* x PVX system.

Symbols: a - average number of local lesions/leaf (20 leaves); IP - Inhibition percentage; Ab - Antibody.

Treatment	LL ^a ± SD	IP %
Mock (control)	88 ± 22	-
Mock + Ab	85 ± 17	4
IFN	51 ± 12	43
IFN + Ab	83 ± 17	6

- virus infection. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 79:2278-2280, 1982.
- Reichman, M.; Devash, Y.; Suhadolnik, R.J. & Sela, I. - Human leukocyte interferon and the antiviral factor (AVF) from virus-infected plants stimulate plant tissues to produce nucleotides with antiviral activity. Virology, 128:240-244, 1983.
13. Rosenberg, N.; Reichman, M.; Gera, A. & Sela, I. - Antiviral activity of natural and recombinant human leukocyte interferon in tobacco protoplasts. Virology 140:173-178, 1985.
14. Sela, I. - Plant-virus interactions related to resistance and localization of viral infections. Adv. Virus Res. 26:210-237, 1981.
15. Stewart II, W.E. - The interferon system, 2nd ed., 493. New York, Spring Verlag, 1981.
16. Van Loon, L.C. - Proceedings of the workshop on pathogenesis related (b) proteins in plants. Netherlands J. Plant Pathol. 89:239-325, 1983.
17. Vicente, M.; De Fazio, G.; Menezes, M.E. & Golgher, R.R. - Inhibition of plant viruses by human gamma interferon. J. Phytopath. 119:25-31, 1987.
18. White, R.F.; Antoniw, J.F.; Carr, J.P. & Woods, R.D. - The effects of aspirin and polyacrylic acid on the multiplication and spread of TMV in different cultivars of tobacco with and without the N-gene. Phytopath. Z. 107:224-232, 1983.

PRODUÇÃO DE INTERFERON POR PLACENTA HUMANA

Maria Alice da Silva Novo
& Romain Rolland Golgher

Laboratório de Vírus
Deptº de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais
Caixa Postal 2486
30161 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

No presente trabalho, foi investigada a produção de interferon nos tecidos da placenta humana induzidos por diferentes vírus. A membrana amniótica mostrou ser mais eficiente produtora de interferon quando infectada pelo vírus da doença de Newcastle (NDV) que a membrana ou as vilosidades coriônicas. A irradiação do NDV com a luz ultravioleta (UV) diminuiu sua capacidade indutora nos três tecidos placentários. Os níveis de interferon encontrados em culturas da membrana amniótica ou coriônica, induzidos por vírus para-influenza I (Sendai), foram muito diferentes, dependendo da placenta utilizada, tanto com o vírus vivo como o tratado com a UV. Quando vilosidades coriônicas foram infectadas com este vírus, não foi encontrada atividade de IFN. Testes comparativos mostraram que o NDV é melhor indutor de interferon do que o vírus Sendai em membrana amniótica. Os vírus Sindbis e Oriboca (vivos ou inativados pela UV) não induziram títulos mensuráveis de interferon em qualquer dos tecidos mencionados. Concluiu-se que o sistema NDV - membrana amniótica é o mais eficiente na indução de IFN e merece investigações mais abrangentes.

Summary

Production of interferon by the human placenta

The production of interferon (IFN) by human placental tissues induced by several viruses was investigated. Amniotic membranes were more efficient than chorionic membranes or villosities when infected with Newcastle disease virus (NDV). Ultraviolet (UV) irradiation of NDV diminished its interferon inducing capacity in the three placental tissues. IFN levels found in amniotic or chorionic membrane cultures induced by live or UV-treated parainfluenza type 1 (Sendai) virus were very inconsistent, depending on the placenta employed; no IFN activity was found in chorionic villosities infected with this virus. Sindbis and Oriboca viruses (live or exposed to UV) did not induce detectable amounts of interferon in any of the tissues mentioned above. Thus, the system NDV - amniotic membranes is the most efficient and it deserves to be explored further.

Introdução

Os interferons (IFN) constituem uma família de proteínas produzidas por células Rev. Microbiol., São Paulo, 19(2):190-195, Abr./Jun. 1988.

de vertebrados, com atividade biológicas diversificadas, das quais a mais bem estudada é a atividade anti-viral.

Estas proteínas têm sido empregadas em ensaios terapêuticos em viroses e cânceres (17). Para o seu emprego no homem, sua produção industrial foi desenvolvida, empregando-se leucócitos de sangue periférico (5), estirpes celulares derivadas de prepúcio humano, especialmente a FS-4 (19), a linhagem celular linfoblastóide, Namalva (20) e mais recentemente, por técnicas de DNA recombinante em bactérias (10) ou fungos (6).

Uma outra fonte de tecido humano utilizada foi o âmnio derivado da placenta (9). Esta é uma matéria prima de baixo custo e de fácil obtenção em nosso meio e, como a metodologia utilizada por Fournier e col. (9) fosse relativamente simples, o que poderia levar à produção de IFN de custo reduzido, resolveu-se investigar o potencial das três partes da placenta-âmnio, córion e vilosidades coriônicas - na produção de interferon.

Material e Métodos

Células Vero - Linhagem derivada de rim de macaco verde (*Cercopithecus aetiops*), adquirida da ATCC (Rockville, Maryland, USA), foi subcultivada em meio 199 suplementado com 5% de soro de carneiro inativado e antibióticos.

Vírus - O vírus da doença de Newcastle (NDV), amostra Victoria, e o vírus parainfluenza I (Sendai) foram multiplicados em ovos embrionados de galinha. Os vírus Sindbis e Oriboca foram crescidos em células HeLa (duas passagens) e em células Vero (passagem final).

Os vírus Sindbis e Oriboca foram titulados em células Vero pela determinação das unidades formadoras de placa (PFU). A infectividade do primeiro também foi avaliada pelo aparecimento de efeito citopático para 50% das câmaras em placas de microtécnica (WID₅₀) (9); e a dos vírus Sendai e NDV, pela medida das doses infectiosas para 50% dos ovos embrionados (EID₅₀) (16). Os títulos dos vírus empregados na indução de interferon foram: vírus Sindbis - 10⁷ a 10⁸ PFU/ml; vírus empregados na indução de interferon foram: vírus Sindbis - 10⁷ a 10⁸ PFU/ml; vírus Oriboca - 10⁵ a 10⁶ PFU/ml; vírus Sendai - 10^{7,8} e 10⁹ EID₅₀/ml; NDV-10⁹ e 10¹⁰ EID₅₀/ml.

A inativação dos vírus pela luz ultravioleta (UV) foi feita pela sua exposição a uma lâmpada germicida colocada a 19 cm de distância das placas de Petri, contendo a suspensão viral. A plataforma contendo as placas oscilava cerca de 65 vezes por minuto. Os fluidos alantóicos, contendo vírus NDV e Sendai, foram dializados contra 20 volumes de PBS (salina tamponada com fosfato pH 7,2; 0,01M) antes da exposição à UV.

Tecidos placentários - As placenta de parto cesareano foram coletadas com frasco contendo solução salina de Hanks (SSH) e antibióticos. A membrana amniótica foi separada da membrana coriônica e lavada em SSH. Estas e as vilosidades coriônicas foram cortadas em fragmentos de aproximadamente 1cm² e lavadas novamente em SSH. Alguns cortes de membrana amniótica foram observados ao microscópio, para verificar se as células estavam livres de granulações grosseiras e se seus limites eram bem visíveis, como indicadores do bom estado da placenta.

Produção de interferon - Os fragmentos de tecido placentário foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 120 ml e pesados. Foram adicionados a 5g de tecido, 4ml de suspensão de vírus conforme mencionado e os frascos incubados por duas horas a 37°C, com agitação de 30 em 30 minutos. O excesso de vírus foi removido e foram acrescentados 30ml de meio 199, suplementado com 2% de soro de carneiro e antibióticos. O tecido foi incubado a 37°C e 24, 48 e 72 horas após a indução, o meio foi colhido e volume igual de meio foi acrescentado. Os meios foram dialisados contra tampão cloreto pH2; 0,06M e, em seguida, contra PBS e conservados a 4°C (máximo 30 dias) ou a -20°C por períodos mais longos.

Titulação de interferon - Foi feita em microtécnica, conforme método descrito por

Ferreira (8) com ligeiras modificações. Células Vero, em placas de microtécnica, foram expostas a diluições dos materiais por 24 horas a 37°C; o meio foi desprezado e as células infectadas com aproximadamente 100 WID₅₀ de vírus Sindbis. As placas foram reincubadas e a leitura foi realizada quando o efeito citopático correspondia a 75% de destruição celular nos controles de vírus. O título do IFN era dado pelo inverso da diluição em que o efeito citopático era reduzido à metade do encontrado nas câmaras de controle de vírus. O coeficiente de variação foi de 53%, em 33 titulações realizadas.

Os títulos apresentados neste trabalho, foram ajustados com o padrão internacional de IFN humano 69/19 para unidades internacionais (UI).

Resultados

NDV como indutor - Os resultados dos experimentos realizados com o NDV, estão representados nas Tabelas 1 e 2. Verificou-se que a viabilidade coriônica não produziu nível mensurável de interferon e que a membrana coriônica apresentou baixo título de interferon, nas 24 horas pós-indução, nos experimentos com o NDV vivo (Tabela 1). Em dez experimentos, a membrana amniótica apresentou bons títulos de IFN (dados não mostrados). A Tabela 2 revela que a eficiência, como indutor, do NDV é gradualmente perdida com o aumento do tempo de irradiação de UV.

Vírus Sendai como indutor - Quando o vírus vivo foi usado como indutor (Tabela 3), observou-se que, de seis e cinco placenta pesquisadas, apenas uma membrana amniótica e uma coriônica produziram bons níveis de IFN, respectivamente.

A ação da luz ultravioleta sobre a capacidade indutora deste vírus foi investigada em cinco placenta. Para isto, o vírus foi submetido à irradiação por 30, 120 e 240 segundos e, em seguida, foi adicionada aos fragmentos dos diferentes tecidos placentários, segundo técnica já descrita em Material e Métodos. De três membranas amnióticas induzidas com vírus Sendai, submetido à irradiação durante 120 segundos, títulos promissores de IFN foram observados em apenas uma (600, 80, 150 UI/0,15ml em 24, 48 e 72 horas respectivamente). E, em outra, os títulos encontrados foram 80, 80 e 40 UI/0,15ml em 24, 48 e 72 horas

Tabela 1 - Produção de interferon em placenta humana. Indução por vírus da doença de Newcastle.

Símbolos: a - Unidades internacionais; b - Média de pelo menos três experimentos.

Tecido	Tempo após indução (h)	Interferon produzido (UI _a /0,15ml)		Variação
		Média _b	Variação	
Membrana amniótica	24	150	80 - 180	
	48	110	40 - 160	
	72	70	10 - 160	
Membrana coriônica	24	30	< 10 - 80	
	48	< 10	0	
	72	< 10	0	
Vilosidade coriônica	24	< 10	0	
	48	< 10	0	
	72	< 10	0	

Tabela 2 - Produção de interferon em placenta humana. Indução por vírus da doença de Newcastle irradiado pela luz ultravioleta.

Símbolos: a - Média de títulos obtidos em unidades internacionais.

Tecido	Tempo após indução (h)	Interferon produzido (UI _a /0,15ml)			Variação
		0	30	60	
Membrana amniótica	24	150	80	80	15
	48	110	40	80	10
	72	70	80	20	< 10
Membrana coriônica	24	30	< 10	< 10	< 10
	48	< 10	< 10	< 10	< 10
	72	< 10	< 10	< 10	< 10
Vilosidade coriônica	24	< 10	< 10	< 10	< 10
	48	< 10	< 10	< 10	< 10
	72	< 10	< 10	< 10	< 10

Tabela 3 - Produção de interferon em placenta humana. Indução por vírus Sendai vivo.

Símbolos: a - Unidades internacionais; b - Placentas 1 a 4 e 5 a 6 foram induzidas pela mesma preparação de vírus.

Tecido	Tempo após indução (h)	Interferon produzido (UI _a /0,15ml)						
		1b	2	3	4	5	6	7
Membrana amniótica	24	< 10	< 10	80	< 10	< 5	10	
	48	< 10	< 10	10	< 10	< 5	5	
	72	< 10	< 10	40	< 10	< 5	10	
Membrana coriônica	24	< 10	160	< 10	< 10	< 5	5	
	48	< 10	160	< 10	< 10	< 5	5	
	72	< 10	40	< 10	< 10	< 5	5	
Vilosidade coriônica	24	< 10	20					
	48	< 10	20					
	72	< 10	20					

80, 80 e 40 UI/0,15ml em 24, 48 e 72 horas

respectivamente, com vírus Sendai irradiado por 30 segundos. Com 240 segundos de irradiação, houve uma queda na produção de IFN (<20UI/0,15ml em 24 a 72 horas). Já com membrana coriônica, os títulos foram inferiores (40, 40 e <5UI/0,15ml em 24, 48 e 72 horas) aos encontrados em âmnio. Portanto, os títulos de interferon foram inconsistentes ou muito baixos.

Comparação entre o NDV e o Vírus Sendai - Face à atividade indutora inconstante do vírus Sendai e à possibilidade de se tratar de fator(es) ligado(s) à membrana amniótica, foram realizados onze experimentos com o propósito de estabelecer um confronto entre a atividade dos dois indutores, utilizando o vírus Sendai vivo e irradiado por 120 segundos e o NDV vivo. Os resultados obtidos (Tabela 4), demonstraram que o NDV sempre induziu maiores quantidades de IFN em relação ao vírus Sendai.

Indução de IFN por vírus Sindbis e vírus Oriboca - Não se conseguiu verificar a presença de IFN nos experimentos realizados, com cada um dos tecidos placentários, usando-se como indutores o vírus Oriboca (quatro experimentos) e o vírus Sindbis (três experimentos) tanto vivos quanto irradiados pela luz ultravioleta (por 10 e 30 segundos para vírus Oriboca; 30 segundos para o vírus Sindbis).

Tabela 4 - Comparação entre os títulos de interferon obtidos pelos vírus da doença de Newcastle (NDV) e Sendai membrana amniótica humana.

Símbolos: a - Unidade internacionais; b - Irradiado pela luz ultravioleta.

Indutor	Tempo após indução (h)	Interferon produzido (UI _a /0,15ml)		
		1 Âmnio	2	3
NDV vivo	24	> 40	160	160
	48	> 40	120	80
	72	> 40	80	40
Sendai vivo	24		4	10
	48		7	5
	72		4	10
Sendai UV _b 2 min.	24	< 10		5
	48	< 10		< 20
	72	< 10		< 20

Discussão

Dentre os tecidos placentários, a membrana amniótica foi a que se mostrou mais suscetível à indução de IFN pelo NDV (Tabela 1). Resultados similares foram obtidos por Gresser & Enders (12); Fournier & col. (9). Contudo, Rita & col. (16) conseguiram produzir IFN em culturas de células coriônicas humanas inoculadas com NDV, amostra Rome. Os dados relatados diferem, provavelmente, destes últimos, devido às diferentes amostras víricas utilizadas.

A Tabela 2 mostra resultados semelhantes aos encontrados por Babayants & col. (11) em leucócitos, isto é, não houve melhora na produção, com a inativação parcial de NDV. Valenta & col. (21) porém, observaram que este vírus, irradiado pela UV por 20 segundos, tinha a capacidade indutora de IFN aumentada em leucócitos humanos. Isto pode ser devido ao menor tempo que o vírus foi submetido à irradiação, pois nos experimentos realizados o tempo inicial foi de 30 segundos.

O vírus Sendai vivo induziu títulos apreciáveis de IFN em apenas duas membranas amnióticas, entre seis pesquisadas, e em uma membrana coriônica, de cinco estudadas (Tabela 3). Conforme pode ser visto em Resultados, quando o vírus era irradiado pela UV, bons títulos foram produzidos, porém o aumento no tempo de irradiação para 240 segundos levou a uma queda na produção de IFN. De modo análogo, Fournier & col. (10) mostraram um aumento na produção de IFN, em membrana amniótica, à medida que aumentava a radiação, sendo que o produto máximo era alcançado com 5.100 ergs/mm². Acima desta quantidade, ocorria uma diminuição no IFN produzido. Outros autores investigaram este problema, como G. Gifford (comunicação pessoal) que observou que era nula (<10) a capacidade de o vírus Sendai vivo ou irradiado produzir IFN em membrana amniótica. Banatvala & col. (2) verificaram que nenhum IFN foi produzido em âmnio, pelo vírus Sendai vivo até 72 horas após indução. Possivelmente, existem anticorpos contra o vírus Sendai em várias placenta humanas ou algum fator neutralizador semelhante ao encontrado em âmnio e córion humanos, infectados por poliovírus (Gresser & col. (13)). Em glóbulos brancos, Falcoff & col. (7), K.E. Mogensen & K. Cantell (comunicação pessoal) observaram não haver vantagens na

produção de interferon pelo vírus Sendai irradiado pela UV.

Tanto o vírus Sindbis quanto o vírus Oriboca, fortemente interferentes em fibroblasto de embrião de pinto (11) não produziram níveis mensuráveis de IFN em tecidos placentários. O primeiro tem sido mostrado como um indutor variável: Bucknall (4) conseguiu produzir altos títulos de IFN em células derivadas de pulmão embrionário humano; entretanto, G. Gifford (comunicação pessoal) demonstrou que apenas 250 unidades por ml foram liberados por fragmentos de âmnio. Além disto, em leucócitos (7) e em fibroblasto de pele e músculo embrionário (3), o vírus Sindbis não mostrou ser bom indutor.

Esta baixa capacidade do vírus Sindbis e vírus Oriboca na produção de IFN pode ser devida à concentração máxima (10^8 PFU/ml) empregada nos experimentos ou conforme sugeriram Billiau & col. (3), à baixa infectividade das amostras usadas para células humanas.

Como se pode verificar dos resultados, a amostra Victoria de NDV provou ser a melhor indutora, dentre os vírus testados em âmnio humano, de modo análogo aos achados de Billiau & col. (3), que usaram fibroblastos embrionários de pele e músculo, em que o NDV e vírus Sendai mostraram ser melhores indutores dentre vários testados.

Dos tecidos placentários, o âmnio é o que produz títulos mais altos e consistentes de interferon e o sistema âmnio-NDV mostrou maior eficiência, e deverá ser investigado de modo mais abrangente.

Agradecimentos

Ao corpo clínico e enfermagem da Maternidade Otaviano Neves e do Hospital São Lucas pelas placenta fornecidas.

A João Rodrigues dos Santos pelo eficiente auxílio técnico, a Angela Sana Lopes pela datilografia e às Drs. Marly Vicente e Gilda de Fazio pela revisão do manuscrito.

Este trabalho foi auxiliado pela CAPES, CNPq (proc. 2222.0687/76) e convênios FINEP Departamento de Microbiologia 324/CT e B/39/253/00/00.

Referências Bibliográficas

1. Babayants, A.A.; Dyuisalieva, R.G. & Marchenko, V.I. - Investigation of the mechanism of interferogenesis stimulation in cells-producers pre-treated with interferon. *Vopr. Virusol.*, 15:431-435, 1970.
2. Bantvala, J.E.; Potter, J.E. & Best, J.M. - Interferon response to Sendai and rubella viruses in human foetal cultures, leukocytes, and placental cultures. *J. Gen. Virol.*, 13:193-201, 1971.
3. Billiau, A.; Joniau, M. & De Somer, P. - Production of crude human interferon with high specific activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 140:485-491, 1972.
4. Bucknall, R.A. - The assay of human interferon. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.*, 14:97-100, 1970.
5. Cantell, K. & Hirvonen, S. - Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 35:138-141, 1977.
6. Deryck, R.; Singh, A. & Goeddel, D.V. - Expression of the human interferon gamma DNA in yeast. *Nucleic Acid. Res.*, 11:1819-1837, 1983.
7. Falcoff, E.; Falcoff, R.; Fournier, F. & Chany, C. - Production en masse, purification partielle et caractérisation d'un interferon destiné à des essais thérapeutiques humains. *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 111:562-584, 1966.
8. Ferreira, P.C.P. - Comparação de métodos na titulação de interferon Fournier, F.; Falcoff, E. & Chany, C. - Demonstration, mass production and characterization of a heavy molecular weight human interferon. *J. Immunol.*, 99:1036-1041, 1967.
9. Goeddel, D.V.; Yelverton, E.; Ullrich, A.; Heyneker, H.L.; Mozzari, G.; Holmes, W.; Seeburg, P.H.; Dull, R.; May, L.; Stebbing, N.; Crea, R.; Maeda, S.; Mc Candliss, R.; Sloma, A.; Tabor, J.M.; Gross, M.; Familletti, P.C. & Pestka, S. -

- Human leucocyte interferon produced by *E. coli* is biologically active. *Nature*, 287:411-416, 1980.
10. Colgher, R.R. - Interferência por arbovírus do grupo C. Belo Horizonte, 1975. (Tese).
11. Gresser, I. & Enders, J.F. - Alteration of cellular resistance to Sindbis virus in mixed cultures of human cells attributable to interferon. *Virology*, 16:428-435, 1962.
12. Gresser, I.; Chany, C. & Enders, J.F. - Persistent polioviral infection of intact human amniotic membrane without apparent cytopathic effect. *J. Bacteriol.*, 89:470-475, 1965.
13. Ho, M. - Animal viruses and interferon formation. In: *Interferons and interferon inducers*. Finter, N.B. ed. Amsterdam, North Holland Publishing, p. 29-44, 1973.
14. Paucker, K.; Cantell, K. & Henle, W. - Quantitative studies on viral interference in suspended L cells. III - Effect of interfering viruses and interferon on the growth rate of cells. *Virology*, 17:324-334, 1962.
15. Rita, G.; Quercioli, A.; Del Grande, L.; Cantagalli, P. & Bocci, V. - Virus-induced interferon in human chorionic and placental cell cultures. In: Rita, G. *The interferons; an international symposium*. New York, Academic Press, p.245-255, 1968.
16. Stewart, W.E. II - The interferon system. 2ed. Viena, Springer Verlag, 1981.
17. Valenta, J.R.; Dicuollo, C.J.; Pagano, J.F.; Faff, R.F. & Ferlauto, R.J. - Human interferon. I - Production. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.*, 14:17-24, 1969.
18. Vilcek, J.; Havell, E.A.; Gradoville, M.L.; Mika-Johnson, M. & Douglas, W.H.J. - Selection of new human foreskin fibroblast cell strains for interferon production. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 110:101-118, 1978.
19. Zoon, K.C. & Buckler, C.E. - Large-scale production of human interferon in lymphoblastoid cells. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 35:145-149, 1977.

PRODUÇÃO DE LEVANA E ETANOL POR MUTANTES DE *ZYMO MONAS MOBILIS* CP4 DURANTE A FERMENTAÇÃO DE SACAROSE

Júlio César Caldeira Ribeiro

CETEC

Setor de Biotecnologia

Av. José Cândido da Silveira, 2000 Horto
31170 Belo Horizonte MG, Brasil

Walter Vieira Guimarães

Arnaldo Chaer Borges

Daison Olzany Silva

& Cosme Damiao Cruz

Depto. de Biologia Geral

Universidade Federal de Viçosa

36570 Viçosa MG, Brasil

Summary

Levan and ethanol production by Zymomonas mobilis CP4 mutants during sucrose fermentation

The hypothesis that the blockage of levan synthesis in *Zymomonas mobilis* CP4 (Lev⁻ mutant) would result in more ethanol production during sucrose fermentation was tested. Sixty-seven cultures originated from *Z. mobilis* CP4 cells treated with NTG were utilized. The estimation of levan production allowed for classification of cultures into five distinct groups, two of these consisting of cultures with greater levan production capacity, one with similar and two with lower capacity than the original CP4 culture. Levan and alcohol were determined quantitatively as a function of sucrose consumption in nine cultures belonging to the group of lower levan production capacity and in one, CP444, which produced the highest amounts of levan. Levan and alcohol production by the nine cultures was equivalent to that of the original CP4 culture, according to the Scott-Knott statistical test. The CP444 culture produced significantly more levan and less alcohol than the other cultures.

The initial hypothesis can not be discarded, however the identification of the CP444 mutant justifies the elaboration on studies with the objective of utilizing *Z. mobilis* CP4 for production of the polymer since levan has innumorous commercial applications.

Resumo

Foi testada a hipótese de que o bloqueio da síntese da levana em *Zymomonas mobilis* CP4 (mutantes Lev⁻) pudesse resultar em um maior rendimento de etanol durante o processo fermentativo de sacarose. Utilizaram-se para o estudo 67 culturas provenientes de células de *Z. mobilis* CP4 tratadas com NTG. A estimativa da produção de levana possibilitou a classificação das culturas em cinco grupos distintos, sendo dois deles constituídos por culturas com

maior capacidade de produção de levana, um com capacidade semelhante e dois com menor capacidade que a cultura CP4 original. A seguir determinou-se quantitativamente o teor de levana e álcool em função do consumo de sacarose de nove culturas pertencentes ao grupo com menor capacidade de produção de levana e de uma, a CP444, que foi a maior produtora de levana. A produção de levana e álcool pelas nove culturas foi equivalente à da cultura CP4 original, pelo teste de agrupamento de médias de Scott-Knott. A CP444 produziu levana em quantidade significativamente maior e álcool em quantidade significantemente menor que as outras culturas. A hipótese inicial não pode ser desconsiderada, porém a identificação do mutante CP444 justifica a realização de estudos visando a utilização de *Z. mobilis* CP4 para a produção do polímero, uma vez que a levana tem inúmeras aplicações comerciais.

Introdução

O etanol produzido no Brasil é obtido basicamente da fermentação de sacarose por leveduras, principalmente estirpes de *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, existem bebidas alcoólicas, de uso bastante difundido em certas regiões tropicais da Ásia, África e América, cuja fermentação é feita por bactérias do gênero *Zymomonas* (17, 20). A possibilidade de utilizar *Z. mobilis* para produção de álcool pode representar uma alternativa para as indústrias. Esta bactéria apresenta tolerância a altas concentrações de glicose, de sacarose e de etanol (16, 17, 20), pode tolerar pH entre 2,5 e 7,5 e apresenta um bom rendimento em etanol (17). Contudo, a *Z. mobilis* apresenta algumas características que dificultam seu uso na produção de etanol em escala comercial. Entre estas destacam-se a capacidade de fermentar apenas glicose, frutose e sacarose (16, 17, 20) e de produzir levana a partir de sacarose, o que diminui a conversão do açúcar em álcool (5, 12, 16).

Importante aspecto desse mecanismo enzimático foi esclarecido para Dawes & col. (5), ao demonstrarem que a levana é produzida a partir de sacarose, mas não de glicose ou frutose ou de mistura de ambos. Embora, se saiba que a principal via catabólica de sacarose inicia-se após a separação hidrolítica das moléculas de glicose, os autores sugeriram que a enzima levana-sacarose pode ser a responsável tanto pela formação de levana quanto pela hidrólise de sacarose, dependendo se o acceptor for frutose ou água, respectivamente, na seguinte reação: n sacarose + acceptor \rightarrow n glicose + frutose ou n levana.

A *Z. mobilis* não parece utilizar o fosforólise na degradação da sacrose o que a torna energeticamente menos eficiente na utilização da sacarose. A principal via catabólica da sacarose inicia-se após a separação hidrolítica das moléculas de glicose e frutose.

Contudo, a demonstração da presença de duas enzimas constitutivas distintas e altamente específicas e com mecanismos de regulação distintos, a glicoquinase e a frutoquinase permitiu a inferência de que a falta de um produto de inibição para ambas as enzimas seja um dos fatores-chaves responsáveis pela alta tolerância desse organismo ao etanol (6, 7).

Diversas estirpes de *Z. mobilis* são capazes de converter glicose e sacarose eficientemente em etanol (16, 17, 20). Assim, as culturas de *Z. mobilis* CP4 consumiram 89,96% de sacarose da cana-de-açúcar, convertendo, em etanol 90-97% da produção teórica em fermentadores de 2,5 l, com agitação. Comparativamente, culturas de *Saccharomyces* spp consumiram 96-98% da sacarose de cana, com uma conversão de apenas 75-79% da produção teórica (14).

Técnicas de genética microbiana e molecular tem sido estudadas em *Z. mobilis* onde se inclui o uso de agentes mutagênicos para melhorar algumas das propriedades da bactéria e, também, facilitar as análises das suas características genotípicas (2, 18, 19).

Foi testada a hipótese de que o bloqueio da via de síntese da levana em *Z. mobilis* CP4 (mutantes Lev⁻) pudesse resultar em um maior rendimento de etanol durante o processo fermentativo de sacarose. Com esse objetivo foram induzidas mutações com

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina em *Z. mobilis* CP4 selecionando-se e caracterizando-se as células mutantes.

Material e Métodos

Foi utilizada a bactéria *Z. mobilis* CP4, isolada por Gonçalves de Lima & col. (9) a partir de caldo de cana fermentado, por ser a recomendada para trabalhos de melhoramento em razão do seu bom crescimento em meio sólido, da tolerância e altos níveis de etanol e da capacidade de doar diversos plasmídios (16). Para o cultivo e conservação da bactéria foi utilizado o meio RM de Goodman & col. (10), contendo 2% de glicose ou sacarose.

A indução de mutações foi feita misturando-se 9 ml de suspensão de células, em fase logarítmica, com 1 ml de solução fresca de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG), na concentração de 50 µg/ml. Após incubação a 28°C por 30 minutos foram adicionados 10 ml de tampão fosfato, pH7,2, para neutralizar a NTG (10). Cuidados especiais foram dispensados para evitar a aspiração de gases de diazometano, um potente agente mutagênico volátil que é formado em condições de meio alcalino (15). A seguir, as células foram centrifugadas a 1.200 x g por 10 minutos, lavadas duas vezes em tampão fosfato e ressuspensas em 10 ml de caldo RM. Aliquotas de 0,1 ml desta suspensão foram transferidas para 10 ml de caldo RM e incubados a 28°C por 2 horas. Foram feitas diluições decimais de cada tubo e foram espalhadas aliquotas de 0,1 ml em placas contendo agar RM-sacarose. Após incubação a 28°C por 48 a 72 h, várias colônias foram purificadas e caracterizadas quanto a capacidade de produzir levana em presença de sacarose.

A avaliação do teor de levana foi feita determinando-se a turvação do meio de cultura após a eliminação das células, seguindo-se a metodologia sugerida por Skotnicki & col. (16). Para verificar se as mutações afetavam a produção de levana nas células foram feitas comparações dos valores de densidade ótica a 600 nm dos sobrenadantes oriundos das culturas testadas, corrigindo-se esses valores pela população de células final e pela densidade ótica do meio de cultura. Os valores foram comparados com os valores obtidos para a cultura original, através de análise de variância e do teste de agrupamento de médias de Scott & Knott (13). As culturas mais promissoras, ou seja, as que apresentaram variação nos valores de levana corrigidos, foram selecionadas para a determinação quantitativa da produção de levana e álcool e do consumo de sacarose. A levana foi separada por precipitação com álcool e centrifugação (16) e seu teor determinado indiretamente pela dosagem da frutose (11). A sacarose não consumida foi determinada no sobrenadante, após a remoção da levana (11). O teor de etanol foi determinado por cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo VARIAN AEROGRAPH, série 2100 com coluna PORAPAK-Q, operando isotermicamente, sendo a temperatura da coluna 165°C, a temperatura do detetor 200°C, a sensibilidade 4 x 10 A/mV, o N₂ o gás de arraste, com fluxo de 10ml/min., e propanol como padrão interno.

Resultados e Discussão

A determinação da produção de levana em 67 culturas provenientes de células tratadas com NTG indicou a existência de diferenças significativas entre os valores de levana após sua correção para uma mesma população final de células.

Foi feito o agrupamento de médias, pelo teste de Scott & Knott (Tabela 1), para se selecionarem os isolados com distintas capacidades de produção de levana. Eles foram separados em cinco grupos, A e E, sendo o grupo C o de culturas com capacidade de produção de levana, semelhante a CP4 original. Pela determinação das curvas de crescimento das culturas CP411, CP439, CP462, representantes do grupo D; CP444, representante do grupo A que apresentou a maior capacidade de produção de levana; e a cultura original (Figura 1), verificou-se que o tratamento com NTG reduzi os tempos de geração dessas culturas em 0; 6,3; 3,5 e 10,3% em relação a CP4 original, respectivamente (Figura 1).

O estudo de produção de álcool e levana em função do consumo de sacarose de 09

Tabela 1 - Teste de agrupamentos de médias de Scott-Knott dos teores de levana expressos em densidade ótica a 600 nm corrigidos pela população final, em isolados de *Zymomonas mobilis* CP4 obtidas por tratamento com NTG.

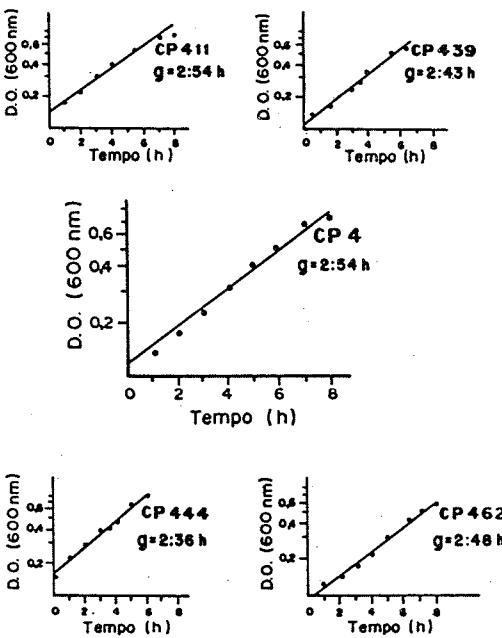
Símbolos: 1/ As médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Scott-Knott; 2/ Meio RM + glucose, 3/ Valores negativos são estimativas de valores zero.

Isolados	Valor das Médias	Isolados	Valor das Médias
CP444	0,671 A ^{1/}	CP453	0,145 D
CP422	0,598 A	CP457	0,145 D
CP469	0,589 A	CP472	0,141 D
CP409	0,566 A	CP464	0,138 D
CP440	0,441 B	CP428	0,136 D
CP437	0,353 C	CP473	0,136 D
CP419	0,321 C	CP471	0,136 D
CP425	0,313 C	CP439	0,136 D
CP430	0,306 C	CP463	0,135 D
CP421	0,297 C	CP459	0,133 D
CP414	0,265 C	CP413	0,129 D
CP412	0,247 C	CP455	0,125 D
CP476	0,226 C	CP438	0,124 D
CP415	0,221 C	CP411	0,120 D
CP441	0,213 C	CP458	0,118 D
CP418	0,212 C	CP436	0,118 D
CP410	0,206 C	CP443	0,115 D
CP427	0,205 C	CP447	0,115 D
CP433	0,204 C	CP449	0,112 D
CP435	0,203 C	CP475	0,109 D
CP4 original	0,202 C	CP460	0,109 D
CP465	0,201 C	CP416	0,107 D
CP446	0,199 C	CP461	0,107 D
CP417	0,199 C	CP448	0,107 D
CP429	0,197 C	CP467	0,106 D
CP423	0,190 C	CP450	0,105 D
CP454	0,188 C	CP470	0,101 D
CP466	0,184 C	CP462	0,091 D
CP420	0,181 C	CP452	0,075 D
CP456	0,176 C	CP445	0,069 D
CP442	0,169 C	CP434	0,013 E
CP431	0,169 C	CP4 original ^{2/}	-0,025 E ^{3/}
CP432	0,166 C	CP424	-0,052 E
CP451	0,164 C	CP426	-0,102 E
CP474	0,158 C		

Tabela 2 - Produção de levana e álcool em função do consumo de sacarose (mg/g) dos isolados de *Zymomonas mobilis* CP4 obtidos por tratamentos com NTG, após 24 h de incubação.

Isolados	Teor de levana	Teor de álcool
CP4 original	65,7	353,9
CP411	36,4	313,3
CP428	58,5	391,2
CP436	69,4	330,4
CP438	70,9	252,4
CP439	60,2	397,7
CP444	205,5	124,3
CP460	67,7	336,7
CP462	52,5	386,7
CP471	38,5	355,6
CP473	73,0	354,7

Figura 1 - Curva de crescimento de *Zymomonas mobilis* CP4 original e dos isolados CP411, CP439, CP444 e CP462 obtidos após o tratamento com NTG.



culturas do grupo D, além da CP444, demonstrou que todas elas apresentaram-se com maior capacidade de consumir sacarose em relação a CP4 original. Contudo, as quantidades de álcool e levana produzidas não foram proporcionais à sacarose consumida. A eficiência da produção de levana de 07 das culturas do grupo D variou de 5,25 a 7,09%, situando-as na faixa de 1 a 2g/1, citada por Dawes & col. (4) como a quantidade produzida por *Z. mobilis* em meio contendo 2% de sacarose.

As culturas CP411 e CP471 tiveram uma menor eficiência que a CP4 original (Tabela 2). A CP444 destacou-se como a maior produtora de levana, 205,5 mg/g sacarose e, a menor produtora de álcool, 124,3 mg/g de sacarose (Tabela 2).

A fermentação de sacarose por *Z. mobilis* resulta em levana e sorbitol entre os subprodutos (1, 21). É provável que tanto um quanto outro interfiram com o rendimento do etanol na fermentação. Barrow & col. (1) demonstraram que o sorbitol origina-se da frutose e sugeriram que a formação do sorbitol resulta da inibição da frutoquinase pela glicose.

As condições experimentais foram favoráveis à produção de levana por *Z. mobilis* em meio contendo sacarose (12, 16) e as análises de variâncias dos dados de produção de álcool e de levana indicaram a existência de diferenças significativas ao nível de 1% de probabilidade. Pelo teste de Scott & Knott (13) a produção de álcool e levana, em função do consumo de sacarose (Tabela 3), indicou que apenas o isolado CP444 apresentou diferença significativa ao nível de 1% de probabilidade em relação a cultura original e aos outros isolados. Assim, constata-se que o isolado CP444 ao produzir mais levana reduziu a produção de álcool. O maior aumento na produção de levana, com reflexo na diminuição da produção de etanol pelo isolado CP444, pode ser considerado como uma indicação do aumento da atividade de levana-sacarose, que participa no processo de síntese da levana, ou da glicose-isomerase, que é a responsável pela conversão de glicose em frutose, e que já foi detectada em *Z. mobilis* (3, 7).

A possibilidade de se obterem mutantes de *Z. mobilis* CP4, que apresentem maior rendimento de produção de álcool e com menor capacidade de produzir levana e outros subprodutos, em meio com sacarose, não pode ser desconsiderada. Embora o objetivo inicial deste estudo tenha sido o de melhoramento de *Z. mobilis* visando à produção de etanol, concluiu-se que a maior produção de levana pelo mutante CP444 foi o resultado mais expressivo.

A realização de estudos para a utilização de *Z. mobilis* na produção deste polímero, uma vez que a levana apresenta numerosas aplicações, pode justificar novas pesquisas com o emprego do mutante obtido, o isolado CP444. Entre as aplicações da levana destacam-se o emprego como fonte de frutose pura e o uso como agente de prolongamento da ação de drogas e como substituto do plasma sanguíneo (8).

Tabela 3 - Teste de agrupamento de médias de Scott-Knott da produção de levana e de álcool em função do consumo de sacarose (g/g) em isolados de *Zymomonas mobilis* CP4 obtidos por tratamento com NTG.

Isolados	Valor das Médias	
	Levana	Álcool
CP411	0,03531 B ^{1/}	0,30910 A
CP471	0,05184 B	0,35915 A
CP462	0,05276 B	0,38833 A
CP428	0,05872 B	0,39487 A
CP439	0,05972 B	0,40414 A
CP4 original	0,06096 B	0,35765 A
CP460	0,06796 B	0,34396 A
CP436	0,06862 B	0,33239 A
CP438	0,07122 B	0,26599 A
CP473	0,07299 B	0,35585 A
CP444	0,21819 A	0,12220 B

Referências Bibliográficas

1. Barrow, K.D.; Collins, J.G.; Leigh, D.A.; Rogers, P.L. & Warr, R.G. - Sorbitol production by *Zymomonas mobilis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20:225-232, 1984.
2. Browne, G.M.; Skotnicki, M.L.; Goodman, A.E. & Rogers, P.L. - Transformation of *Zymomonas mobilis* by a hibrid plasmid. *Plasmid*, 12:211-214, 1984.
3. Campos-Takaki, G.M.; Takaki, M.; Rios, E.M. & Araújo, J.M. - Glucose isomerase from *Zymomonas mobilis*. *Rev. Microbiol.*, SP, 15:82-85, 1984.
4. Dawes, E.A.; Ribbons, D.W. & Large, P.J. - The route of ethanol formation in *Zymomonas mobilis*. *Biochem. J.*, 98:795-803, 1966.
5. Dawes, E.A.; Ribbons, D.W. & Rees, D.A. - Sucrose utilization by *Zymomonas mobilis*. Formation of levan. *Biochem. J.*, 98:804-812, 1966.
6. Doelle, H.W. - Kinetic characteristics and regulatory mechanisms of glucokinase and frutokinase from *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14:241-246, 1982.
7. Doelle, H.W. - The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 15:20-24, 1982.
8. Elisashvili, V.I. - Levan synthesis by *Bacillus* sp. *Appl. Biochem. and Microbiol.*, 20:101-106, 1984.
9. Gonçalves de Lima, O.; Shumucher, I.E. & Araujo, J.M. - New observation about the antagonistic effects of *Zymomonas mobilis* var. *Récifensis*. *Rev. do Instituto de Antibióticos, Recife*, 12:57-69, 1972.
10. Goodman, A.E.; Rogers, P.L. & Skotnicki, M.L. - Minimal medium for isolation of auxotrophic *Zymomonas* mutants. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 44:496-498, 1982.

11. Kulka, R.G. - Colorimetric estimation of ketopentoses and ketohexoses. *Biochem. J.*, 63:542-548, 1956.
12. Park, Y.K.; Mortatti, M.P.L. & Sato, H.H. - Study on levan formation during fermentation of *Zymomonas mobilis* on sucrose. *Biotechnol. Lett.*, 5:515-518, 1983.
13. Scott, A.S. & Knott, M.A. - Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30:507-712, 1974.
14. Shalita, Z.P.; White, M.D.; Katz, M.; Zur, M. & Mizrahi, A. - Ethanol production by *Zymomonas mobilis* CP4 from sugar cane chips. *Biotechnol. Lett.*, 3:729-733, 1981.
15. Silhavy, T.J.; Berman, M.L. & Enquist, L.W. - Experiments with gene fusions. *Cold Spring Harbor*, 1984. 303p.
16. Skotnicki, M.L.; Lee, R.J.; Tribe, D.E. & Rogers, P.L. - Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* strains. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 41:889-893, 1981.
17. Stokes, H.W.; Dally, E.; Spaniel, D.T.; Willians, R.L.; Montenecourt, B.S. & Eveleigh, D.E. - *Zymomonas*: The phantom ethanol producer. *Biosources Digest.*, 3:124-132, 1981.
18. Stokes, H.W.; Dally, E.; Yarlonsky, M.D. & Eveleigh, D.E. - Comparison of plasmids in strains of *Zymomonas mobilis*. *Plasmid*, 9:138-145, 1983.
19. Suntinanaalest, P.; Pemberton, J.P. & Doelle, H.W. - The production of ethanol plus fructose sweetener using fructose utilization negative mutants of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, 8:351-356, 1986.
20. Swings, J. & De Ley, J. - The Biology of *Zymomonas*. *Bact. Reviews*, 41:1-46, 1977.
21. Viikari, L. & Gisler, R. - By products in the fermentation of sucrose by different *Zymomonas* strains. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.*, 23:240-244, 1986.

PRODUCTION OF GLYCOLIPIDS BY *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* GROWN ON GALACTOSE

Mercia Breda*
 & Thuioshi Ioneda

Instituto de Química
 Deptº de Bioquímica B-9-T
 Caixa Postal 20780
 01498 São Paulo SP, Brasil

Resumo

O cultivo de *Rhodococcus rhodochrous* em galactose ao invés de glicose resulta em alteração drástica da composição da fração glicolipídica. Cerca de 40% do extrato solúvel em éter etílico é constituído de dimicolato de trehalose (cord factor), sendo a fração de mono-(C40) - mycoloylgalactose encontrada em pequena quantidade (1%). Ao contrário, as células cultivadas em glicose possuem aproximadamente 41% de mono-(C40-C46)-mycoloylglicose e somente 0,1% de dimycoloyltrehalose.

Summary

The growth of *Rhodococcus rhodochrous* in galactose instead of glucose results in a drastic change of the glycolipid fraction composition. About 40% of the extract soluble in diethyl ether is constituted by trehalose dimycolates (cord factor), and only 1% of mycoloylgalactose is found in contrast to the glucose grown cells which contain mono-(C40-C46)-monomycoloylglycose accounting for 41% and dimycoloyltrehalose representing only 0.1% of the extracts.

Introduction

The so-called CMN group organisms (3), *Corynebacterium*, *Mycobacterium* and *Nocardia*, are producers of high molecular weight α -branched- β -hydroxylated fatty acids (C32, C90 and C50-mycolic acids, respectively) (2) and of the corresponding diesters of trehalose, which are known as cord factors (11,13). Pioneering investigations carried out on the toxicity of lipids from *M. tuberculosis* (4) led to the identification of a glycolipid fraction (6,6'-di-(C90)-mycoloyltrehalose) (14) as the main component which caused, by intraperitoneal inoculation, the appearance of wasting symptoms and an abrupt decrease of the body weight as well as the death of the treated animals. A lower homolog (6,6'-di-)C32)-mycoloyltrehalose) further found in *C. diphtheriae* (8,15,19) also displayed similar properties to those exhibited by mycobacterial cord factor (12).

Studies on lipids from microorganisms which produce higher homologs of corynomycolic acids (C40-mycolic acids, *Rhodococcus rhodochrous*; C50-mycolic acids, *N. asteroides*, *N. brasiliensis*; C60-mycolic acids, (*R. bronchialis*) led to the isolation of corresponding diesters of trehalose (17). Complementary investigations carried out on lipids from *R. rhodochrous* showed a particular ability of this strain to synthesize 6-(C40-C46)-mycoloylglycose (18), acylsucrose

* ex-fellow from CAPES

(9) and mycoloylmannose (1) as well, according to the carbon source supplied. In this communication, we describe that by culturing *R. rhodochrous* on galactose, a high level of dimycolyltrehalose is produced instead of mycoloyl ester of the sugar supplied. These findings show an effect which is opposite to that observed when the same strains is grown on glucose.

Material and Methods

All solvents were distilled before use. Corynomycolic acid (8) and 6,6'-dicorynomycoloyltrehalose (8,14,18) were isolated from *C. diphtheriae*; and (C40-C46)-mycoloylglycerol (15), 6,6'-di-(C40-C46)-dimycoloyltrehalose (7) and 6-(C40-C46)-mycoloylglucose (17) were extracted from *R. rhodochrous*.

Palmitic acid was from Sigma Chemical Co, Saint-Louis, MO, U.S.A.; triolein from Calbiochem, San Diego, C.A., U.S.A.; Yeast extract was from Oxo Limited, London, England; Amberlite IR-120 (H^+) and IR-410 (OH^-) were from British Drug Houses Chemicals Ltd, Poole, England.

Column chromatography was carried out on a 50% (W/W) silicic acid (Carlo Erba, Milano, Italy) and silica gel H (E. Merck AG, Germany, FRG). Thin layer chromatography (TLC) was carried on silica gel H using the following solvents: chloroform/acetone/methanol/water (50/60/2.5/3, V/V/V/V) (solvent A); hexane/diethyl ether/acetone/acetic acid (70/20/5/1, V/V/V/V) (solvent B) and hexane/diethyl ether/acetone/acetic acid (70/30/11/1, V/V/V/V) (solvent C). Ascending paper chromatography was developed on Whatman n° 1 paper using 1-butanol/pyridine/water (6/4/3, V/V/V) (solvent D); isopropanol/acetic acid/water (7/1/2, by vol.) (solvent E); for descending paper chromatography a mixture of 1-butanol/pyridine/water/toluene (5/3/3/4, by vol., upper phase) (solvent F) were used. Lipids on TLC plates were detected under atmosphere of iodine vapours. Glycolipids were revealed by anthrone/sulfuric acid spray reagent (17) and phospholipids by spraying molybdenum-blue reagent (21). Paper chromatograms were revealed with silver nitrate/potassium hydroxide dip reagent (20).

Mild alkaline hydrolysis (for hexose ester) was carried out as follows: 5.8mg of glycolipid were dissolved in 1ml chloroform/methanol (1/2, V/V) then 0.2ml of 4N sodium hydroxide was added. The mixture was kept for 2 h at room temperature (25° C), and acidified with four drops of 2N HCl. Then 5ml distilled water and 5ml diethyl ether were added; the aqueous phase was re-extracted 5 times with diethyl ether. The diethyl ether extract was washed with distilled water, then concentrated to dryness.

The remaining aqueous phase was successively filtered through columns of Amberlite IR-120 (H^+) and IR-410 (OH^-), and concentrated in dissecator containing concentrated sulfuric acid and pellets of sodium hydroxide.

Drastic alkaline hydrolysis (for trehalose mycolate) was carried out as follows: to 217mg of glycolipid, 5ml 90% (V/V) ethanol and 0.15ml 33% KOH were added, and the system kept under reflux for 12 h. The reaction mixture was extracted essentially as described above.

Acid hydrolysis of the residue (17mg) of the aqueous phase was carried out as follows: 1ml of distilled water and 4ml of 5% (V/V) sulfuric acid were added and refluxed for 4 h. After cooling, the mixture was filtered on Amberlite-410 (OH^-) and concentrated as previously described. Sugar content was determined by phenol/sulfuric acid (5) and, glucose by glucose oxidase, according to the Sigma Chemical Bulletin N 510 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.). Trehalose was acetylated as already described (15).

Infrared spectra were recorded either on a Perkin Elmer model 283 or 180 infrared spectrophotometer; melting point was determined under a hot stage Kofler microscope. Optical rotations were measured on a Hilger polarimeter with the material dissolved in chloroform.

Results and Discussion

The diethyl ether soluble lipids from *Rhodococcus rhodochrous* grown on 1%

galactose, accounting for 7.4% of the cell residue, showed on TLC (solvent A) a major glycolipid spot with a migration rate similar to that of 6,6'-dicyrionymycoloyltrehalose. It is worth mentioning that in a previous investigation on the same strain grown on glucose, an increased production of 6-mono-(C40-C46)-mycoloylglycose was observed while the amount of the trehalose dimycolate was lowered to a level of approx. 0.1% (18).

Therefore, the occurrence of an intense spot with a behaviour of diester of trehalose by growing the same strain in a medium containing galactose as the carbon source was an unexpected finding.

Isolation of the glycolipid material was carried out initially by fractionation of the lipid extract on silicic acid/silica gel column chromatography into three main groups: 1) neutral + fatty acids; 2) glycolipids; and 3) phospholipids, accounting for approximately 26.2%, 34.8% and 39.0%, respectively.

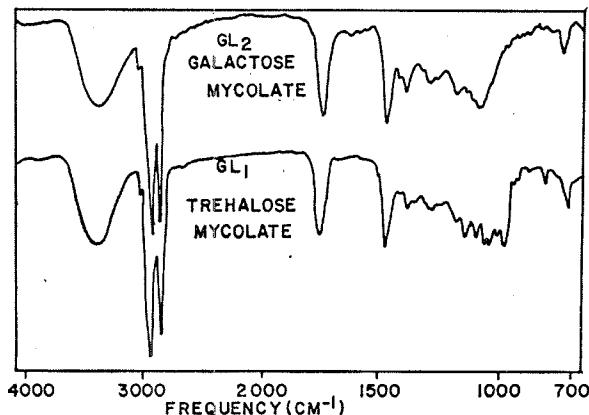
The glycolipid fraction after repurification by column chromatography showed on TLC (solvent A) two glycolipids: a main component (GL1, 32.4% of the extract with $R_f = 0.36$ similar to that of di-C32-mycoloyltrehalose and a minor component (GL2, 1.0% of the lipid extract) which migrated like 6-(C40-C46)-mycoloylglycose ($R_f = 0.58$).

Physico-chemical characteristics of the glycolipids are shown in Table 1. While the infrared spectrum (Fig. 1) of GL1 has in the fingerprint region characteristic absorptions those of diester of trehalose (6,10), the spectrum of GL2 displayed peak at 1070, 1097, 1120 and 1169 cm^{-1} .

Table 1 -
Physico-chemical
characteristics of
the glycolipids
isolated from
Rhodococcus
rhodochrous grown on
galactose.
Symbols: ^aTLC on
silica gel H, Merck;
solvent system:
chloroform acetone/
methanol/water (50/
60/2.5/3, V/V/V/V).

Glycolipids	Characteristics		
	mp °C	$[\alpha]^{25}_D$	R_f^a
GL1	66-70	+56.99	0.36
GL2	24-26	+15.49	0.58

Figure 1 - Infrared spectra of the glycolipids isolated from *Rhodococcus rhodochrous* grown on galactose, as solvent free films recorded on Perkin-Elmer, model 180 infrared spectrophotometer.



Glycolipids GL1 and GL2 released in the aqueous phase after alkaline hydrolysis, trehalose and galactose, respectively, identified by paper chromatography (solvents D, E, F).

The aqueous phase from GL1 released after alkaline hydrolysis showed $[\alpha]^{25}_D = +163$ ($C = 0.5$; H_2O), coincident with that of standard trehalose. On the other hand, the peracetylated derivative of the aqueous phase from GL1 exhibited on IR spectrum absorptions similar to those of trehalose octaacetate. It had mp 74-75°C, without depression in admixture with the authentic sample, and $[\alpha]^{25}_D = +172$ ($C = 0.4$; $CHCl_3$).

The aqueous phase from GL1 after acid hydrolysis reacted with aniline phthalate, and the determination of the sugar content gave equivalent values either using the phenol sulfuric acid or glucose oxidase.

The ether soluble fractions from GL1 and GL2 after alkaline hydrolysis represented 77 and 78%, respectively, and behaved on TLC (solvent C) like corynomycolic acid ($R_f = 0.45$); their methyl ester derivatives behaved on TLC ($R_f =$

0.5) (solvent B) similarly to methyl mycolate of the same organism previously described (13).

Therefore, the glycolipids produced by *R. rhodochrous* grown on galactose are: 1) diester of trehalose "cord factor", which is the prominent component, and the minor fraction detected is mycoloyl galactose.

Under similar conditions, *M. smegmatis* produces high levels of glycolipid fraction; however, its physico-chemical characteristics are distinct from those of trehalose mycolate: moreover its alkaline hydrolysis releases no trehalose in the aqueous phase.

It is of interest to note that there is only a single difference between an steric arrangement of C4-hydroxyl group of the sugar unit which promotes sharp and diverse changes on the composition of the glycolipid fraction. Studies on distinctive adaptive mechanism for regulating the lipid composition of microorganisms under different culture conditions deserves further investigations.

Moreover, the possibility in increasing the content of trehalose mycolate may be very useful for studying the participation of toxic component (trehalose mycolate from *R. rhodochrous* has been also observed to display toxic properties, unpublished results) on the mechanisms of pathogenicity of trehalose mycolate producing organisms, such as *Nocardia asteroides*, *N. caviae* and *N. brasiliensis*.

Acknowledgements

This investigation was supported by grants from FAPESP and FINEP. We wish to express our thanks to Miss L. Mari for reading and to Miss L. Ribeiro for typing the manuscript. We wish to express our thanks to Dr. Y. Kawano for recording infrared spectra. This investigation was carried out as part of a program of the International Research Group on Pathogenicity of Actinomycetales.

Reference

1. Almeida, E.T. & Iionedda, T. - Composition and toxicity of lipids from *Rhodococcus rhodochrous* grown on mannose. In Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomytetes. Eds. G. Szabó, S. Biro and M. Goodfellow, Budapest, Hungary, p. 669-671, 1986.
2. Asselineau, J. - Bacteriol lipids. Hermann, Holden-Day Inc., Publishers, San Francisco, 1966.
3. Barksdale, L. & Kim, K. - *Mycobacterium*. Bacteriol. Rev., 41:217-372, 1977.
4. Bloch, H. - Studies on the virulence of tubercle bacilli isolation and biological properties of a constituent of virulent organism. J.Exp.Med., 91:197-218, 1950
5. Dubois, M., Gilles, R.A., Hamilton, J., Rebers, P.A. & Smith, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal.Chem., 28:350-356, 1956.
6. Goren, M.B., Brokl, O. & Koller, P. - Cord factor (trehalose-6,6'-dimycolate) of in vivo-derived *Mycobacterium lepraeumurium*. Biochim.Biophys.Acta, 574:70-78, 1979.
7. Iionedda, T., Lederer, E. & Rozanis, J. - Sur la structure des diesters de trehalose ("cord factor") produits par *Nocardia asteroides* et *Nocardia rhodochrous*. Chem.Phys.Lipids, 4:375-392, 1970.
8. Iionedda, T., Lenz, M. & Pudles, J. - Chemical constitution of a glycolipid from *Corynebacterium diphtheriae* PW8. Biochem.Biophys.Res.Commun., 13:110-114, 1963.
9. Iionedda, T.; Niigaki, N.T. & Kawano, Y. - Glycolipids from *Rhodococcus rhodochrous* grown on sucrose. In: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Eds. G. Szabó, S. Biró and M. Goodfellow, Budapest, Hungary, p. 673-674, 1986.
10. Iionedda, T. & Silva, C.L. - Isolation and partial characterization of esters of trehalose from *Corynebacterium ovis* (*C. pseudotuberculosis*). Chem.Phys.Lipids, 23:63-68, 1979.

- 11.Ioneda, T., Silva, C.L. & Gesztesi, J.L. - Mycolic acid containing glycolipids of Nocardiae and related organisms. *Zbl.Bakt.Suppl.*, 11:401-406, 1981.
- 12.Kato, M. - Site of action of the cord factor of *Corynebacterium diphtheriae* in mitochondria. *J. Bacteriol.*, 107:746-752, 1971.
- 13.Lederer, E. - Cord factor and related trehalose esters. *Chem.Phys.Lipids*, 16:91-106, 1976.
- 14.Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J. & Lederer, E. - Chemical structure of the cord factor of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim.Biophys.Acta*, 20:299-309, 1956.
- 15.Senn, M., Ioneda, T., Pudles, J. & Lederer, G. - Spéctrometrie de masse de glycolipids. I. Structure du "cord factor" de *Corynebacterium diphtheriae*. *Eur.J.Biochem.*, 1:353-356,
- 16.Silva, C.L. & Ioneda, T. - Purification and characterization of mononocardomycoloylglycerol from *Nocardia rhodochrous*. *Chem.Phys.Lipids*, 20:217-223, 1977.
- 17.Silva, C.L., Geztesi, J.L. & Ioneda, T. - Trehalose mycolates from *Nocardia asteroides*, *Nocardia farcinica*, *Gordona lentifragmenta* and *Gordona bronchialis*. *Chem.Phys.Lipids*, 24:17-25, 1979.
- 18.Teixeira, M.C.Z., Ioneda, T. & Asselineau, J. - Glycolipids from *Nocardia rhodochrous* grown on glucose. *Chem.Phys.Lipids*, 37:155,164, 1985.
- 19.Thomas, D.W., Matida, A.K., Silva, C.L. & Ioneda, T. - Esters of trehalose from *Corynebacterium diphtheriae*: a modified purification procedure and studies on the structure of their constituent hydroxylated fatty acids. *Chem.Phys.Lipids*, 23:267-282, 1979.
- 20.Trevelyan, W.E., Procter, D.P. & Harrisson, J.S. - Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, 166:444-445, 1950.
- 21.Vaskovsky, V.G., Kostetsky, - Modified spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J.Lipid.Res.*, 90:396-396, 1968.

DESIGN OF A LIQUID CULTURE ROTATOR

Massanori Takaki
Luiz Roberto Jordão
& Wagner Batista Lopes

Deptº de Botânica UNESP
Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

Summary

The construction of a liquid culture rotator, using cheap available materials is described.

Resumo

A construção de um agitador de cultura líquida com a utilização de materiais baratos e disponíveis é descrita.

Introduction

The use of liquid culture is described in microbiological experiments (3) and in biotechnological research for cell suspension culture (1). In those cases, the liquid culture must be aerated by the use of rotatory or orbital shakers. When test tubes are employed difficulty arise due to the necessity of especially designed rotators. The construction of an orbital shaker with citrus juicer has been described previously (2).

In this paper the construction of a rotator of liquid culture in test tubes is described.

Design of the rotator

The design of the rotator is shown in the figure 1. The motor C of electrical timer (Philips, Brasil) was used because of the low rotation obtained in this system without any modification. In the third gear 1 rpm can be obtained. In this gear one pulley (D) was fixed. To this pulley one elastic band (E) was used for traction of axis (B) of the same diameter. The axis is supported with a PVC (polyvinyl chloride) end plug (H) and one metallic ring (F) fixed in the plastic box (G). The motor (C) was fixed in one point with the aid of a screw (M) and at opposite side by one spring (L) to regulate the traction of the elastic band (E). To this axis one perforated disc (A) was fixed.

In those perforations PVC tubes (5cm x 1 inch) (W) were fixed with the aid of Superbonder (Loctite do Brasil, Itda, Brasil). In those tubes the test tubes containing liquid culture can be fixed with thin pieces of foam. The advantage of this system is the 110 or 220 V alimentation of the motor. The motor was fixed in a plastic box (G) obtained in a local electronic components shop.

The inclination of the tubes can be regulated with the screws (I) and the sows (J) put at each side of the U shaped plastic piece (K).

The figure 2 shows the detailed construction and fixation of the motor (C) in the box (G) and of the PVC end plug (H) and the spring (L).

The figure 2A shows the detail of the disc A with PVC tubes (N) fixed on the holes and the axis B. The figure 2B shows the frontal view of the box (G) with motor (D) fixed with a screw (M) at one point and at opposite side the spring (L)

Figure 1 - Design of the liquid culture rotator.
The symbols are described in the text.

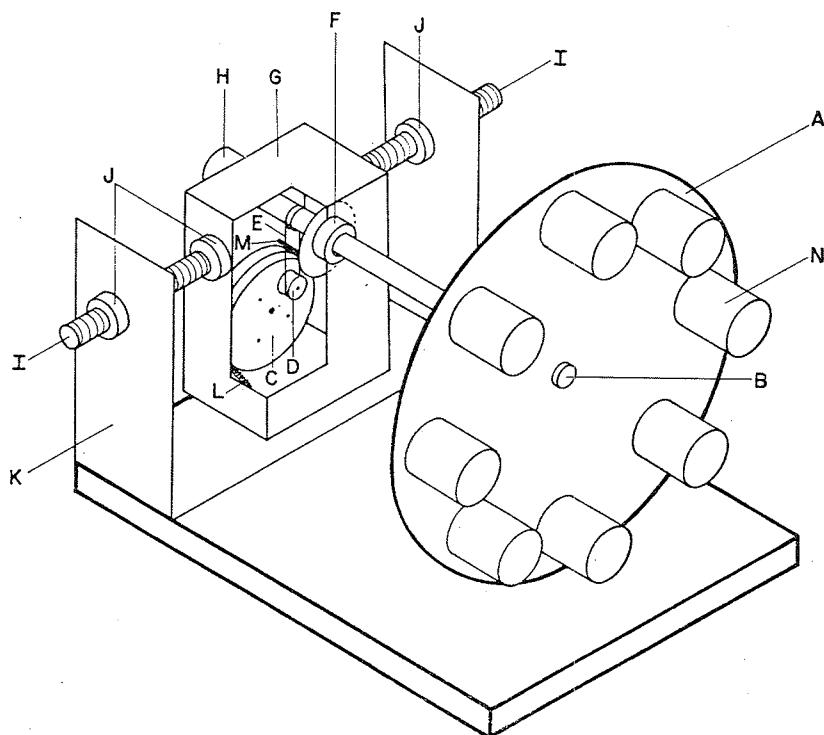
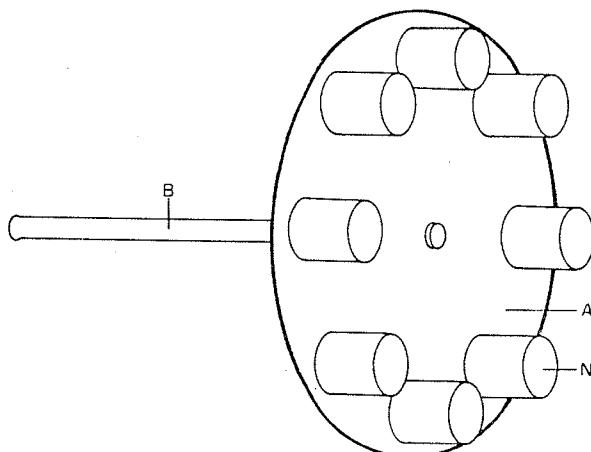
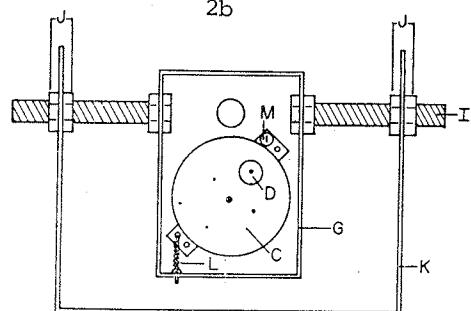


Figure 2 - Details of the construction of the rotator.

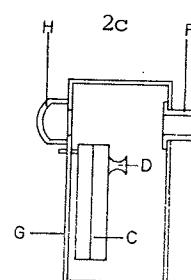
2a



2b



2c



fixed to the wall of the box (G) with a screw. The inclination of the test tubes can be obtained with the adjutment of the sows (J) on the screws (I). The figure 2C shows the positions of the PVC end plug and ring (F) fixations in the box G and the position of the motor (C).

Acknowledgement

M.T. supported by a CNPq Research Fellowship (300992/81).

References

1. Beakes, G.W.; Campos-Takaki, G.M.; Takaki, M. & Dietrich, S.M.C. - Cultural, physiological and structural aspects of thallospore formation and germination in *Ellisomyces anomalus* (Thamniidaeae). *Trans.Brit. Mycol. Soc.*, 83:593-605, 1984.
2. Takaki, M. & Jordão, L.R. - An orbital shaker with citrus juicer. *Arq. Biol. Tecnol.*, 29:671-673, 1986.
3. Wetter, L.R. & Constabel, F. - Plant tissue culture methods, 2nd ed., NRCC, Saskatchewan, 145p, 1982.

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Eventos promovidos pela Sociedade Brasileira de Microbiologia 2º Semestre de 1988

- 1 - VIII Simpósio Nacional de Fermentações
3 a 7 de Agosto
Hotel Primus - São Lourenço - MG
- 2 - I Encontro Nacional de Leveduras
SBM, Instituto de Ciências Biológicas UFMG e Instituto de Ciências Biomédicas da USP
11 e 12 de Agosto
Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte - MG
- 3 - II Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental
SBM, Comitê Latino Americano de Microbiologia Ambiental e Instituto de Ciências Biomédicas da USP
13 a 16 de Outubro
Hotel Majestic - Águas de Lindóia - SP
- 4 - IV Simpósio de Microbiologia Clínica
SBM, Universidade Federal do Rio de Janeiro
6 a 8 de Novembro
Hotel Glória - Rio de Janeiro - RJ
- 5 - I Simpósio Nacional de Controle Biológico de Pragas e Vetores
SBM, Instituto Oswaldo Cruz, Sociedade Brasileira de Virologia
16 a 18 de Novembro
Hotel Glória - Rio de Janeiro - RJ
- 6 - 80 Anos de Paracoccidioidomicose
SBM, Instituto de Ciências Biomédicas da USP e Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
23 a 25 de Novembro
Casa da Cultura Japonesa - USP - São Paulo - SP
- 7 - III Simpósio sobre Microbiologia de Alimentos
SBM, Universidade Federal de Santa Catarina
23 a 27 de Novembro
Universidade Federal de Santa Catarina - Florianópolis - SC

Programa de Projetos Especiais de Pesquisa
FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

O Conselho Superior da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, deliberou investir parte de seu patrimônio líquido em Projetos Especiais que contribuem para fortalecer e atualizar a atividade de pesquisa no Estado de São Paulo, em áreas ou temas relevantes para o desenvolvimento da ciência e da tecnologia. Esse investimento não afetará o programa tradicional de auxílios e bolsas que será mantido com a mesma orientação que vem sendo adotada.

Os projetos devem corresponder a temas ou áreas específicas, podendo ser desenvolvidos por pesquisadores de uma ou mais instituições.

As propostas devem ser encaminhadas à Diretoria Científica da FAPESP, Rua Pio XI, 1500, CEP 05060, São Paulo - SP, até 30 de julho/88 (primeira fase) ou até 31 de

outubro/88 (segunda fase).

Na análise das propostas será levada em conta a existência de contrapartida, devendo esta consistir em recursos alocados ao programa apresentado, e não a gastos de rotina na(s) entidade(s) em que o programa será desenvolvido.

Para maiores informações, dirigir-se à Diretoria Científica.

Programa de Aquisição de Livros Técnico-Científicos FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

O Conselho Superior da FAPESP aprovou um programa destinado exclusivamente à aquisição de livros técnico-científicos.

O programa não tem caráter permanente. Ele visa possibilitar a recuperação e/ou atualização deste importante acervo no suporte de pós-graduação e da pesquisa científica no Estado de São Paulo.

As solicitações deverão ser encaminhadas à Diretoria Científica da FAPESP no período de maio a agosto/88.

Para tanto, os Departamentos das Universidades e as Divisões (ou Setores equivalentes) dos Institutos de pesquisa deverão adotar o seguinte procedimento:

- 1) elaborar, segundo as normas técnicas de indicação bibliográfica, a lista dos livros pretendidos e o respectivo orçamento.
- 2) justificar a solicitação.
- 3) relacionar, a partir de 1985, a produção científica do Departamento ou Setor solicitante.

Caberá aos responsáveis pelos pedidos que foram aprovados pela FAPESP proceder a compra direta no Exterior através do apoio das bibliotecas (ou seções especializadas) da Instituição solicitante.

Os livros adquiridos deverão ser oficialmente incorporados ao acervo da Instituição e a comprovação documental deste fato será um dos requisitos obrigatórios para a aprovação da prestação de contas do auxílio recebido.

Para maiores informações, dirigir-se à Diretoria Científica.

Cole, J.A. & Ferguson, S.J. (eds.). - The nitrogen and sulphur cycles. Cambridge, Cambridge University. Simposium 42. 1988. 490 p.

Este livro trata do 42º Simpósio da Society for General Microbiology, realizado em janeiro de 1988 na Universidade de Southampton e publicado em 11 de fevereiro do mesmo ano. Dos diferentes aspectos em que os microrganismos do solo participam, há que se destacar os ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, elementos que as plantas mais necessitam para seu desenvolvimento. A opção de se incluir em conjunto, os ciclos do enxofre e do nitrogênio se baseia na semelhança que ocorre entre os mesmos, consubstanciada na sequência de reações produtoras de energia, quando componentes reduzidos como NH_3 , NO_2 , H_2S e S são oxidados pelo oxigénio ou quando componentes oxidados sofrem redução em condições anaeróbias para produzir compostos voláteis. Aliás, o tratamento conjunto dos dois ciclos foi já objeto de estudo anterior de diferentes autores. A diferença está no enfoque dado neste livro aos aspectos bioquímicos e à sua regulação genética, contribuindo dessa forma para a compreensão do estabelecimento ecológico dos microrganismos que participam desses dois ciclos. Constitui-se, portanto, de um compêndio de elevado interesse para os estudiosos do assunto que queiram se aprofundar e se atualizar (a bibliografia mencionada é recente, sendo boa parte dela referente aos anos de 1986-87) nos aspectos bioquímicos das transformações metabólicas promovidas por esses microrganismos. A discussão dos assuntos é feita de forma ordenada e atraente onde as principais conclusões são abordadas, e os pontos que ainda merecem ser estudados são destacados. O primeiro dos capítulos de autoria de S.J. Ferguson, relata "As reações de oxirredução dos ciclos do nitrogênio e enxofre". Este capítulo procura dar uma visão molecular do mecanismo de produção de energia no processo da fosforilação oxidativa, quando a energia de oxirredução do transporte de elétrons é convertida em energia de ligação de ATP, através da

teoria de acoplamento quimiosmótico.

A seguir são encontrados cinco capítulos referentes ao ciclo do enxofre e dez referentes ao ciclo do nitrogênio.

Embora a farta literatura sobre os diferentes aspectos do processo oxidativo no ciclo do enxofre, muita coisa ainda precisa ser investigada para se ter uma visão clara que mostre a relação dinâmica entre os diversos fenômenos envolvidos. A oxidação dos compostos reduzidos do enxofre, por exemplo, pode ser de natureza química pelo oxigênio ou biológica, em condições aeróbias ou anaeróbias, com a participação de grupos de bactérias sem relação taxonômica, como tiobacilos e fototróficos. O processo se complica pela ocorrência de inúmeros compostos do enxofre em diferentes estados passíveis de oxidação por determinada espécie ou grupo de bactérias. Dessa forma, B.B. Jorgensen analisa algumas dificuldades envolvidas no estudo da oxidação de sulfetos no capítulo "Ecologia do ciclo do enxofre: vias oxidativas em sedimentos", enquanto que D.P. Kelly discute os aspectos bioquímicos da oxidação de compostos inorgânicos do enxofre no capítulo: "Oxidação de compostos do enxofre".

As vias de redução do sulfato podem ser estudadas sob diferentes aspectos. Num primeiro, H.D. Peck e T. Lissolo analisam no capítulo "Redução assimilatória e dissimilatória do sulfato: enzimologia e bioenergética", respectivamente os processos bioquímicos envolvidos nessas transformações e bem como, os aspectos bioenergéticos em *Desulfovibrio*. Num segundo, A. Kroger e col. tratam no capítulo "Oxidação do acetato com enxofre e sulfato como aceptores terminais de elétrons" dos aspectos relativos às vias de transporte de elétrons e consequentemente de produção de energia, quando diferentes aceptores terminais são usados por *Desulforomonas acetoxidans* e *Desulfovibrio postgatei*. Mais ainda, G. Voordouw, no capítulo "Biologia molecular das proteínas de oxirredução na redução do sulfato", analisa a sequência de gens que codificam a hidrogenase periplasmática e o citocromo C₃ que funciona como doador/aceptor de elétrons da hidrogenase em *Desulfovibrio vulgaris*.

Dizer-se que a mesma distribuição de assuntos foi adotada para os capítulos referentes ao ciclo do nitrogênio é redundância dada a semelhança entre os dois ciclos. O primeiro estudo abordado por J.G. Kuennen e L.A. Robertson no capítulo "Ecologia da nitrificação e desnitrificação", reflete a preocupação dos autores quanto à quebra do balanço entre esses dois fenômenos antagônicos, pela alteração das condições ambientais. A seguir, P.M. Wood analisa os mecanismos de oxidação da amônia em bactérias autótrofas, que usam esse processo para obter energia, e nos heterótrofos inferiores e animais superiores tendo por base o disposto no capítulo "Monoxigenase e mecanismos mediados por radicais livres para oxidação de amônia". Ainda, as vias bioquímicas da redução do nitrato são discutidos por W.G. Zumft e col. no capítulo "Aspectos bioquímicos e fisiológicos da desnitrificação".

Da mesma forma que o sulfato, o nitrato pode ser absorvido por plantas ou microrganismos ou ainda em condições anaeróbias sofrer redução por bactérias facultativas. Diferentes quesitos inerentes a esses processos foram formulados por J.A. Cole sendo que os progressos obtidos nesta década foram revistos no capítulo "Redução assimilatória e dissimilatória do nitrato à amônia". Por outro lado, e com base nas seguintes premissas: identificação das vias bioquímicas de assimilação do nitrogênio, conhecimento do estado fisiológico das células sob diferentes condições de suprimento de nitrogênio e análise genética dos gens estruturais que modificam as respectivas enzimas, M.J. Merrick propôs o estudo da "Regulação da assimilação de nitrogênio em bactérias".

O capítulo "Nitrogenases convencionais e alternativas" foi discutido por R.R. Eady e col. tendo em vista o conhecimento genético e enzimológico de *Azotobacter*. As nitrogenases convencionais, entenda-se são Mo-dependentes enquanto que as alternativas são Mo-independentes, sendo inclusive estimuladas por vanádio. Ainda dentro desse tema, os avanços científicos referentes ao "Papel do oxigênio e hidrogênio na fixação de nitrogênio" foram revistos por M.G. Yates. O mecanismo de regulação da fixação do nitrogênio diferencia-se ao se considerar a bactéria estudada. Isso levou R. Dixon a rever os aspectos de controle genético de *Klebsiella pneumoniae*, *Azotobacter* e *Rhizobium* no capítulo "Regulação genética da fixação do nitrogênio". Porém, além dos gens requeridos para fixação (*nif*), outros

estão envolvidos no processo da nodulação (*nod*). Em outros termos, a fixação simbiótica do nitrogênio compreende, não somente a expressão da nitrogenase, mas também todo o mecanismo que leva o *Rhizobium* infectar a raiz até se transformar em bacteróide. Esses aspectos são revistos por A.W.B. Johnston e col. no capítulo "Análise dos gens simbióticos de *Rhizobium*". O desfecho do presente livro está em seu último capítulo "Fixação do nitrogênio por *Desulfovibrio*", desenvolvido pelo consagrado J.R. Postgate e seus cols. que vinculam o ciclo do nitrogênio ao do enxofre. *Desulfovibrio* participa da redução dissimilatória do sulfato e fixa nitrogênio porém sem eficiência. A existência de uma minoria de linhagens dessa bactéria contendo gens nit em plasmídios sugere que esses gens podem ser geneticamente transferidos na natureza neste ou em outros gêneros. Os autores mostram que apesar de uma resposta limitada na fixação de nitrogênio, a fisiologia de *Desulfovibrio* parece ser similar aos conhecidos fixadores em todos os diferentes aspectos.

Ely Nahas
 Faculdade de Ciências Agrárias e
 Veterinárias de Jaboticabal UNESP
 Deptº de Microbiologia
 Rodovia Carlos Tonani, Km 5
 14780 Jaboticabal SP

A França pesquisa o mapa genético: Entrevista com o geneticista francês Jean Frézal

CENDOTEC - Centro Franco-Brasileiro de Documentação Técnica e Científica
 Av. Waldemar Ferreira, 204
 05501 São Paulo SP, Brasil

Paralelamente ao "Programa Apolo da Biologia" lançado pelos americanos, que pretendem reconstituir a molécula de ADN antes do final do século, existe outro programa de âmbito mundial: o do mapa genético, em que a pesquisa francesa ocupa uma posição de liderança. Sem dúvida, esse projeto - cujos debates realizaram-se recentemente em Paris - trará à ciência conhecimentos decisivos. O prof. Jean Frézal, diretor da unidade de Genética Médica do Hospital Necker-Enfants Malades de Paris, foi o organizador do congresso. Nesta entrevista ao jornal francês *Le Figaro*, ele expõe as perspectivas e os problemas trazidos por um avanço que, em suas palavras, virá "revolucionar a Medicina dos próximos 15 anos".

Por sua vez, o prof. Jean Dausset, prêmio Nobel de Medicina em 1980, participa do debate sobre os perigos das manipulações genéticas. Ampliando as colocações de Jean Frézal, ele sugere alguns princípios simples, que poderiam servir de base para um "código de boa conduta" das ciências da vida.

Pergunta: O congresso organizado pelo senhor é um acontecimento científico importante, pois se realiza apenas de dois em dois anos e reúne a nata dos geneticistas do mundo todo. O senhor poderia especificar-nos o que espera de seus resultados?

Resposta: Inicialmente, uma palavra sobre seu objetivo, que nem sempre é bem compreendido. Essa conferência pretende contribuir para um conhecimento mais exato do mapa genético do homem e das outras espécies animais. Ou seja, tentamos detectar, com precisão e acuidade cada vez maiores, os genes nos cromossomos. O conceito de mapa dá-nos um ângulo de visão diferente do programa americano, que procura determinar os elementos químicos que compõem a gigantesca molécula de ADN; um programa monumental, ocasionalmente chamado de "Programa Apolo da Biologia", e que provavelmente é um objetivo final.

Estou convicto de que um congresso como o que acaba de acontecer em Paris virá acelerar o conhecimento do patrimônio hereditário. As informações de que dispomos atualmente abrangem cerca de 5% dos genes do homem, o que não é pouco. Esse encontro reativa e coordena melhor os trabalhos internacionais e também franceses;

dessa forma, antes do final do século poderemos conhecer uma proporção muito maior de tais genes.

Quanto ao interesse mais amplo desse exercício, que pode parecer importante apenas aos 450 pesquisadores que vieram de quase todos os países do mundo, inclusive da China: penso que ele irá revolucionar a Medicina dos próximos 15 anos. Em minha opinião, mais do que a declinação das bases constitutivas do genoma (objetivo do programa americano), é o conhecimento do mapa genético que nos fornecerá elementos para compreendermos um grande número de doenças, algumas importantes; são doenças que conhecemos bem, mas cujo mecanismo ainda não conseguimos captar, apesar das muitas pesquisas a respeito.

Pergunta: Trata-se, suponho, de doenças orgânicas?

Resposta: Não apenas orgânicas! Sem dúvida, causará surpresa - e realmente é estimulante - saber que essas pesquisas também se referem a afecções cujas manifestações dizem respeito basicamente à Psicologia e à Psiquiatria; cada vez mais, são localizados nos cromossomos genes responsáveis por essas doenças. É o caso da psicose maníaco-depressiva, de certas formas de demência senil e pré-senil; ou mesmo dessa doença com um nome poético, a doença de Gilles de La Tourette, descoberta no século XIX, e que se caracteriza por uma desordem que parece puramente psicológica, pois o paciente apresenta tiques e uma incômoda propensão para dizer obscenidades...

Pergunta: Não há o risco de esse processo levar a uma concepção determinista, orgânica, do homem normal?

Resposta: Não creio. A idéia de que tudo estaria determinado pelo que está inscrito em nosso patrimônio hereditário não me agrada, e considero-a totalmente errônea. É indiscutível que o meio ambiente e a experiência de cada indivíduo modelam e modulam a informação impressa em seu patrimônio hereditário. O homem é e continuará a ser definitivamente imprevisível - felizmente! Mesmo que conhecêssessem toda a sequência de seus genes, não poderíamos desprezar a participação do acaso, esse grande motor da vida, que permanecerá sempre invencível. Não costumo proferir atos de fé, mas creio que a vida é probabilista e que nenhuma de suas opções, nenhuma de suas escolhas está totalmente determinada. No nível mais elementar da vida, no estágio mais orgânico da formação dos seres - por exemplo, para formar uma proteína - a união de duas moléculas não ocorre sempre da mesma forma, pois está sujeita às condições externas.

Pergunta: Dito isso, e sem mesmo abordarmos as manipulações genéticas: certos progressos da Genética, nos quais se baseia a "Medicina previsiva" tão cara ao prof. Dausset, suscitam problemas éticos que põem em jogo a liberdade humana. Sob esse aspecto, que pensa o senhor do papel dos comitês de Ética? Como ensinar o homem a viver com o conhecimento de si mesmo?

Resposta: Nada seria mais absurdo que desistirmos de compreender os determinismos, com o pretexto de que nem tudo está determinado. Tenho o maior respeito pelo prof. Dausset - tanto pelo homem como pelo cientista. Sem dúvida, a Medicina previsiva, que é o caminho em que ele está empenhado, suscita problemas, mas proporcionais aos imensos serviços que ela pode prestar. Graças às descobertas que valeram a Jean Dausset o prêmio Nobel, será possível, por exemplo, determinar quais os indivíduos predispostos ao diabetes insulinodependente, bem como os que estão caminhando para a doença, antes que esta se torne aparente. Evidentemente, a questão é: que medidas tomar, a qual grau de coerção recorrer para detê-los nesse caminho? Mas tudo indica que disporímos de meios para retardar, atenuar e até mesmo prevenir uma moléstia cujas consequências são extremamente pesadas para o doente, para sua família e para a sociedade.

A esse respeito, o senhor empregou uma fórmula que me parece adequada: o homem precisa aprender a viver com o conhecimento de si mesmo que ele pode ter. Isso significa que não se devem misturar os gêneros, e que é preciso não confundir, no homem de ciência, o pesquisador - cuja vocação é levar avante o conhecimento -, com o homem - que deve refletir como homem sobre os problemas de aplicação desse conhecimento. As questões de ética que proponho a mim mesmo são de minha competência enquanto homem e não enquanto cientista. Desse ponto de vista, parece-me evidente que os cientistas não devem constituir uma categoria à parte, cujas ações fossem isentas de qualquer crítica. A ciência deve ser o mais

transparente possível, e cabe à sociedade pesar suas consequências. É nesse sentido que caminha o Comitê Francês de Ética, e creio ser aconselhável evitar tudo o que possa diminuir sua autoridade. (CENDOTEC)

Para quaisquer informações:

Pr. Jean Frézal
Unité de Génétique Médicale
Hôpital Necker - Enfants Malades
149, rue de Sèvres
75743 Paris Cedex 15 - France
Tél.: (1) 566.97.55

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

MCT  CNPq  finep

