

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 19 Número 3 Jul.-Set. 1988

Instruções aos autores

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

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

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

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual Biological Journals" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras de IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nan (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 "Berger'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 (abreviatio 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 Rég. (Wash.).

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autoria, 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 brilhante, com contrastes adequados 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 Uzedo
Instituto de Microbiologia UFRJ
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I — Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ

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

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

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

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

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

Atlas Indústrias Químicas S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares

Embrabio - Empresa Brasileira de Biotecnologia Ltda.

Indústrias Químicas e Farmacêuticas Schering S.A.

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

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

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
 PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
 VOLUME 19 JULHO-SETEMBRO 1988 NÚMERO 3
 REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 19(3)

CONTEÚDO

CONTENTS

Ricci, L.C.; Serafim, M.B.; Siqueira, P.S. de; & Castro, A.F.P. de	217 Uso de eritrócitos de diferentes origens em testes sorológicos para a detecção da enterotoxina termolábil (LT) de <i>Escherichia coli</i> , de origem humana e suína	Some features on the growth of <i>Microcystis aeruginosa</i> Kuetz. emend. Elenkin in ASM-1 medium
Cáceres, O.; & Vieira, A.A.H.	223 Alguns aspectos do crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> Kuetz. emend. Elenkin in ASM-1 medium	Microflora in corn (<i>Zea mays</i>) crop, Red-Yellow Latosol sand phase, treated with vinasse in Rio Claro, State of São Paulo, Brazil
Tauk, S.M.	229 Microbiota telúrica de latossolo Vermelho-Amarelo, com cultura de milho (<i>Zea mays</i>), tratado com vinhaça, no município de Rio Claro, SP	Comparative evaluation of the Staphy-Test and the tube coagulase test for the identification of pathogenic <i>Staphylococci</i> from animal sources
Gatti, M.S.V. Castro, A.F.P. de; & Hara N.H.	235 Comparação do Staphy-Test e o teste de coagulase em tubo, na identificação de amostras patogênicas de Estafilococos de origem animal	Semiquantitative culture of intravenous catheters
Queiroz, D.M. de M.; & Mendes, E.N.	241 Estudo bacteriológico semi-quantitativo de pontas de catéteres endovenosos	Circulation flow of enteropathogenic bacteria in institutional children. III - Serologic study
Lacerda, M.D.; Pontes, J.D.C.; & Hofer, E.	247 Circulação de enterobactérias patogênicas em menores institucionalizados: III - Estudo sorológico	Comparative fermentation of glucose and sucrose by <i>Zymomonas mobilis</i>
Mortatti, M. da P.L.; & Park, Y.K.	253 Estudo comparativo da fermentação de glicose e sacarose por <i>Zymomonas mobilis</i>	

Nascimento, D. do; Sabioni, J.G.; & Pimenta N.	258	Freqüência de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvasora (EIEC) em queijo tipo Minas-Frescal da cidade de Ouro Preto-MG	Incidence of enteropathogenic and enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> in Minas-Frescal cheese from Ouro Preto, MG, Brazil
Avila-Campos, M.J.; Farias, L. de M.; Carvalho, M.A.R. de; Damasceno, C.A.V.; & Cisalpino, E.O.	262	Atividade hemolítica de <i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i>	Hemolytic activity of <i>Actinobacillus</i> <i>actinomycetemcomitans</i>
Araújo, F.L. de; & Ricciardi, I.D.	266	Atividade biológica do lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Moraxella</i> <i>bovis</i>	
Maugeri Fº, F.; & Goma, G.	271	Degradação termofílica de celulose com <i>Clostridium</i> <i>thermocellum</i>	Thermophilic degradation of cellulose by <i>Clostridium</i> <i>thermocellum</i>
Penha, E. das M.; Rosemberg, J.A.; & Silveira, M.M. da	277	Definição de um meio de cultura para produção de celulases por <i>Botrytis</i> SP	Cellulase production by <i>Botrytis</i> sp.: a culture medium definition
Tauk, S.M.	282	Aspectos da microbiota fúngica do solo de cultura de milho (<i>Zea</i> <i>mays</i>), tratado com vinhaça, no município de Rio Claro, SP	Aspects of fungal microflora in corn (<i>Zea mays</i>) crop soil treated with vinasse in Rio Claro, State of São Paulo, Brazil
Mezzari, A.; Cauduro, P.F.; & Dias, C.A.G.	290	Ocorrência de fungos em população urbana: amostragem de um laboratório privado em Porto Alegre, RS	Incidence of fungi in urban population. Data of a private laboratory in Porto Alegre, RS
Scroferneker, M.L.; Netto, C.F.; & Schalch, A.L. de O.;	293	Contribuição ao conhecimento da composição antigênica do <i>Paracoccidioides</i> <i>brasiliensis</i> , Estudo de 5 amostras	
Carvalho, Y. de; & Milanez, A.I.	306	Sensibilidade de <i>Pythium splendens</i> Braun a íons de metais pesados	Sensitivity of <i>Pythium splendens</i> Braun to heavy metals

Scroferneker, M.L.; Netto, C.F.; Schalch, A.L.O.; & Mota Neto, A.A.	311	Soros hiperimunes anti- <i>Paracoccidioides</i> <i>brasiliensis</i>	
Paula, C.R.; Gambale, W.; Iaria, S.T.; & Reis Fº, S.A.	317	Ocorrência de fungos em manteigas oferecidas ao consumo público no Município de São Paulo	Occurrence of fungi in butter available for public consumption in the city of São Paulo
Nahas, E.; & Assis, L.C. de	321	Caracterização da pilase secretada por <i>Rhizopus oligosporus</i>	Characterization of lipase secreted by <i>Rhizopus oligosporus</i>
Gatti, M.S.V.; Castro, A.F.P. de; Camargo, I.J.B. de; & Hara, N.H.	327	Incidência de rotavírus em suínos na região de Campinas - SP	Incidence of porcine rotaviruses at region of Campinas, S.P., Brazil
Paulillo, A.C.; Pinto, A.A.; Machado, R.Z.; & Kronka, S.N.	333	Teste de inibição da migração de leucócitos (IML) para detecção "in vitro" da imunidade celular na doença de Newcastle	Leucocyte migration inhibition test (IML) for the <i>in vitro</i> detection of cellular immunity in Newcastle disease
Lagrota, M.H. do C.; Wigg, M.D.; Santos, M.G.M. dos; Pinto, A.V.; & Pinto, M. do C.F.R.	338	Atividade antivirótica de naftoquinonas. II - Derivados 1,4-naftoquinônicos frente a enterovírus	Antiviral activity of naphthoquinones. II - 1,4-naphthoquinones derivatives against enteroviruses
Informação Técnico-Científica SBM	344		

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

USO DE ERITRÓCITOS DE DIFERENTES ORIGENS EM TESTES SOROLÓGICOS PARA A DETECÇÃO DA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL (LT) DE *ESCHERICHIA COLI*, DE ORIGEM HUMANA E SUÍNA

Lucila Costallat Ricci

Recebido para publicação em 16/06/87

Marlene Braide Serafim

Paula Salek de Siqueira

& Antônio Fernando Pestana de Castro

Deptº de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas

Caixa Postal 6109

13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

Os testes sorológicos de imuno-hemólise passiva (IHP), imuno-hemólise radial (IHR) e hemaglutinação indireta (HI), utilizados no diagnóstico da enterotoxina termolábil (LT) de *E. coli*, são normalmente desenvolvidos usando-se hemácias de carneiro. Neste trabalho analisamos a possibilidade dos mesmos serem realizados com eritrócitos das seguintes origens: galinha, boi, cobaia, coelho e humana, utilizando-se amostras de *E. coli* enterotoxigênicas de origem humana e suína, produtoras de enterotoxina termo-lábil (LT). Com relação à IHP, observamos resultados negativos quando usamos nos testes hemácias de cobaia e humanas. Resultados parcialmente concordantes aos de carneiro foram encontrados com as hemácias de galinha e coelho, na faixa de 35,7% a 66,7%. Nas provas de IHR e HI todos os eritrócitos analisados foram sensibilizados pela enterotoxina LT, embora com afinidades diferentes. Em todos os testes analisados, os resultados obtidos com as hemácias bovinas foram 100% concordantes aos observados com hemácias de carneiro. Em vista disto, concluímos que dentre as hemácias estudadas, a única que substitui satisfatóriamente a de carneiro nos testes sorológicos utilizados para detecção de LT é a de origem bovina.

Summary

Serological assays such as passive immune-haemolysis (PIH), radial immune-haemolysis (RIH), and indirect haemagglutination (IH), used for the detection of thermolabile (LT) enterotoxin of *Escherichia coli*, are generally carried out with sheep red blood cells. In this work, the above mentioned assays were performed with erythrocytes from other sources (human, chicken, bovine, guinea-pig, and rabbits) and the results were compared with the ones obtained in the standard assays carried out with sheep erythrocytes. The PIH assays performed with chicken and rabbit erythrocytes detected from 35,7% to 66,7% of the LT-producing strains identified by the standard assay and those performed with guinea-pig and human erythrocytes yield only negative results. The RIH and IH assays showed that all erythrocytes studied were sensitized by the LT enterotoxins with variable affinities. The results of all serological tests performed with bovine erythrocytes were identical to the ones obtained with the

Este trabalho foi subsidiado pela FINEP e FAPESP.

Rev. Microbiol., São Paulo, 19(3):217-222, Jul./Set. 1988.

standard assays. Therefore, we conclude that only bovine red blood cells can substitute sheep erythrocytes in the serological tests carried out for detecting LT enterotoxin.

Introdução

A toxina colérica produzida pelo *Vibrio cholerae* e a enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli* (1), quer de origem humana quer de origem suína, apresentam muitas propriedades semelhantes, em especial no que concerne a determinantes antigênicos comuns, além dos determinantes específicos (3, 4, 13). A ligação das mesmas a células sensíveis é feita através dos seus respectivos fragmentos B e dos gangliosídeos GM1 existentes nestas células (6, 7, 17, 21). Quanto às suas atividades biológicas, estas enterotoxinas ativam a adenil-ciclase e são capazes de causar diarréia no homem e/ou animais sensíveis (5, 6, 17).

Entre as reações sorológicas usadas para a detecção destas enterotoxinas, se acham bem estudadas a imuno-hemólise passiva (IHP) (2, 19), a imuno-hemólise radial (IHR) (18, 20) e a hemaglutinação indireta (HI) (16), nas quais se observa uma sensibilização "natural" das hemácias de carneiro pelas enterotoxinas LTs, sem que haja a necessidade de qualquer agente ligante, geralmente necessário para a sensibilização de eritrócitos por抗ígenos protéicos (14). Resultados anteriores (8, 9, 10, 11, 12, 15) mostram que o fenômeno de sensibilização das hemácias deve ser devido à presença nestas células do gangliosídeo GM1, que serviria como receptor para as enterotoxinas eventualmente existentes em sobrenadantes de culturas de amostras de *E. coli* produtoras de LT.

O presente trabalho teve como propósito verificar a possibilidade de hemácias de outros animais, incluindo a do homem, de serem sensibilizadas pela enterotoxina LT utilizando para tal os testes de IHP, IHR e HI. Sob o ponto de vista prático, dependendo das disponibilidades dos laboratórios, tais testes poderiam ser adaptados para outros tipos de hemácias. Esta pesquisa poderia colaborar também no estudo da distribuição de receptores para estas enterotoxinas em membranas celulares, em especial eritrócitos de diferentes origens, tomando-se como base a maior ou menor sensibilização destas células pela enterotoxina LT.

Material e Métodos

Amostras - Selecionamos para o trabalho 28 amostras de *E. coli*, procedentes de casos de diarréia no homem e em suínos. Destas amostras, 10 eram de origem humana, sendo 8 produtoras da enterotoxina termolábil (LT^+) e 2 não enterotoxigênicas (LT^-).

As restantes eram de origem suína, sendo 16 LT^+ e 2 LT^- .

Preparo de extratos - As amostras de *E. coli* foram semeadas em erlenmeyers de 125ml contendo 10ml do meio "Casamino Acids-Yeast Extract" (CAYE) (2). Após 18 horas de incubação a 37°C em estufa de agitação (250 rpm/minuto), adicionou-se polimixina B ao meio, na concentração final de 0,22mg/ml.

Cerca de 15 minutos após a adição do antibiótico, as culturas foram centrifugadas a 3.000 rpm por 40 minutos e seus sobrenadantes separados e mantidos a -20°C.

Preparo dos antissoros - A antitoxina colérica foi preparada em cavalo e em coelhos. O cavalo foi inoculado com 500 μ g da toxina colérica purificada (Sigma) e o coelho com 100 μ g da mesma. Em ambos os casos, a toxina foi ressuspensa em tampão PBS 0,02M, pH 7,4 e misturada a igual volume do adjuvante completo de Freund. Inoculou-se a toxina pela via intramuscular, repetindo-se a imunização com adjuvante incompleto de Freund, após 25 e 50 dias. Após a sangria dos animais, os soros foram inativados a 56°C por 30 minutos e absorvidos, por 3 vezes, com papa de hemácias de mesma origem que as utilizadas nas reações sorológicas em estudo.

Origem das hemácias - Para que pudéssemos estudar a sensibilização de vários

eritrócitos pela enterotoxina LT escolhemos hemácias das seguintes origens: boi, galinha, coelho, cobaia e do homem. As hemácias foram coletadas em solução de Alsever e mantidas a 4°C. Todos os resultados obtidos com estas hemácias nos testes de IHR, IHP e HI, foram comparados aos observados com hemácias de carneiro.

Testes de imuno-hemólise - O teste de IHP foi desenvolvido segundo Castro & Col. (2), utilizando-se ao invés de tampão veronal, a trietanolamina, pH 7,4, com 0,05% de gelatina (14). Como na realização do teste de IHP medimos a quantidade de hemoglobina liberada após a reação hemolítica, foram analisadas as curvas de absorção das hemoglobinas de diferentes origens. Assim sendo, para cada tipo de hemácia estudada traçamos uma curva de absorção da hemoglobina na faixa de comprimento de onda de 410 a 600nm (Espectrofotômetro 295II, Micronal). A suspensão original de cada eritrócito foi padronizada diluindo-se as hemácias 1/20 em água destilada, acertando-se a absorbância para 0,42 a 550nm antes de ter a hemoglobina dosada nesses comprimentos de onda.

A prova de IHR foi realizada segundo a técnica descrita por Yano & Col. (20). Resumidamente, agarose a 1% foi preparada em tampão trietanolamina, acrescido de azida sódica a 0,02%. A esta, foram acrescidas hemácias padronizadas a 0,42 de D.O. (550nm), após diluição da suspensão a 1/20 em água destilada. As suspensões de hemácias - agarose eram então vertidas sobre tampas de placas de microtípulo (8x10) e deixadas solidificar.

A seguir, em posições pré-determinadas, eram feitos no gel orifícios de 4mm de diâmetro, nos quais aplicavam-se sobrenadantes de cultura com as toxinas em estudo e, após um período de difusão, as antitoxinas. Complemento diluído 1/10 era, então, vertido sobre as placas.

Teste de hemaglutinação indireta - O teste de hemaglutinação indireta foi desenvolvido segundo Ricci e Castro (16). Hemácias padronizadas como nos testes de imuno-hemólise, foram sensibilizadas com sobrenadantes de cultura (V/V) a 37°C por 30 minutos. Cerca de 25µl de hemácias sensibilizadas foram posteriormente colocadas em uma lâmina de vidro à qual se adicionou o soro antitoxina colérica, preparado em coelhos, e após homogeneização da mistura, soro anti-IgG de coelho, preparado em carneiro. Novamente a reação foi homogeneizada e após 2 minutos, procedia-se a leitura contra um fundo branco.

Resultados e Discussão

Quanto à absorção da hemoglobina, podemos observar na Tabela 1, que no comprimento de onda de 420nm, no qual normalmente se realizam as leituras do teste de IHP, apenas a hemoglobina de galinha absorve com menor intensidade que a de carneiro. Conseqüentemente, quando se utiliza no teste de IHP a hemácia de galinha, a sensibilidade do teste fica diminuída se utilizarmos a mesma padronização adotada para as hemácias de carneiro. Com relação às outras hemoglobinas, verificamos que a 420nm todas apresentaram uma absorbância superior à da hemoglobina de carneiro. Além disso, quando se correlacionou a padronização, diluindo-se a suspensão de hemácias 1:20 em água destilada e acertando-se $A_{550}=0,42$, com o número de eritrócitos, verificamos algumas diferenças consideráveis. Assim sendo, observamos que o número de células por ml, para as hemácias de galinha ($12,2 \times 10^7$) e boi (60×10^7), foram inferiores ao observado para as hemácias de carneiro ($77,2 \times 10^7$). Este fato deve diminuir a sensibilidade dos testes hemolíticos com relação às primeiras hemácias. Ao contrário, esta observação não se aplicaria às hemácias de origem humana (104×10^7) e às de coelho (165×10^7), com valores superiores aos encontrados para as hemácias de carneiro (dados não apresentados em tabela).

Seguindo as técnicas normalmente utilizadas nos testes sorológicos de IHP, IHR e HI feitos com hemácias de carneiro, procurou-se pesquisar a sensibilização de diferentes hemácias pela enterotoxina LT. Pode-se observar na Tabela 2 que as hemácias bovinas apresentaram resultados 100% concordantes com os de carneiro, independentemente do teste a ser considerado. Com relação às hemácias de cobaia, obtivemos resultados negativos na IHP. O teste de HI, por outro lado, com este

mesmo tipo de hemácia, mostrou 50% ou mais de resultados positivos, na dependência da origem da amostra, enquanto que no teste de IHR, entre 24 amostras de *E. coli* estudadas apenas 2 foram positivas.

Embora com resultados variáveis, as hemácias de galinha e de coelho foram melhor sensibilizadas pela enterotoxina LT que as hemácias de cobaia, haja visto que ambas apresentaram testes de IHP positivos, o que não havia ocorrido com hemácias de cobaia.

Ainda na Tabela 2, observamos que os resultados dos testes de IHP com hemácias humanas foram negativos. Por outro lado, no teste de IHR com estas mesmas hemácias, encontramos 87,5% de concordância com os obtidos com hemácias de carneiro, independentemente da origem da amostra. No teste de HI as concordâncias foram respectivamente 28,6% para a LT de origem suína e 37,5% para a LT de origem humana.

Tabela 2 - Estudo da sensibilização de diferentes hemácias, pela enterotoxina LT produzida por amostras de *E. coli*, de origem humana e suína, através das provas sorológicas de IHP^a, IHR^b, HIC^c.

Símbolos: a = Imuno-hemólise passiva; b = Imuno-hemólise radial; c = Hemaglutinação indireta; d = Número de amostras enterotoxigênicas com resultados positivos com a hemácia em questão/número de amostras enterotoxigênicas positivas com a hemácia de carneiro, pela mesma prova sorológica;; e = Porcentagem de concordância de resultados positivos em relação aos obtidos com hemácias de carneiro.

Origem das hemácias	Provas sorológicas					
	IHP		IHR		HI	
	amostras humanas	amostras suínas	amostras humanas	amostras suínas	amostras humanas	amostras suínas
Boi	8/8 ^d (100) ^e	16/16 (100)	8/8 (100)	16/16 (100)	8/8 (100)	16/16 (100)
Galinha	4/6 (66,7)	4/8 (50)	8/8 (100)	12/16 (75)	6/8 (75)	4/7 (57,1)
Coelho	3/8 (37,5)	5/14 (35,7)	8/8 (100)	10/15 (66,7)	5/8 (62,5)	4/7 (57,1)
Homem	0/8 (0)	0/15 (0)	7/8 (87,5)	14/16 (87,5)	3/8 (37,5)	2/7 (28,6)
Cobaia	0/7 (0)	0/11 (0)	1/8 (12,5)	1/16 (6,3)	4/8 (50)	4/7 (57,1)

Pelos resultados obtidos nas provas sorológicas para a detecção de LT, verificou-se que as hemácias bovinas tiveram 100% de concordância com os observados com hemácias de carneiro, podendo, portanto, substituí-las nos testes em questão. Quanto às demais hemácias, outros estudos devem ser levados a efeito para verificar a possibilidade das mesmas serem usadas nos testes investigados. Assim, por exemplo, as hemácias humanas e de coelho poderiam ter a sua concentração aumentada, principalmente nos testes de IHR, numa tentativa de se melhorar a sensibilidade da prova feita com estes eritrócitos. Quanto às hemácias de galinha, apesar de terem apresentado resultados semelhantes aos de coelho, não são recomendadas pela dificuldade de coleta e por não sofrerem lise total na padronização, o que certamente acarretaria erros na leitura espectrofotométrica.

As diferenças de sensibilização pela LT observadas nas hemácias estudadas, podem fornecer subsídios importantes para que se possam pesquisar e identificar diferenças qualitativas e/ou quantitativas de receptores para a enterotoxina LT de *E. coli*. Assim, as hemácias de cobaia seriam as menos sensibilizadas por esta toxina, seguidas pelas hemácias humanas, sendo que as hemácias de galinha e de

Tabela 1 - Absorção das preparações de hemoglobulinas de diferentes espécies na faixa de 410 a 600nm.

D.O.	Origem das Hemácias				
	Carneiro	Boi	Galinha	Cobaia	Humana
410	4,5	4,9	1,9	4,4	4,6
420	3,1	3,65	1,4	3,0	3,5
440	0,8	0,82	0,62	0,9	0,8
460	0,38	0,385	0,39	0,45	0,39
480	0,26	0,24	0,33	0,04	0,24
500	0,23	0,2	0,31	0,3	0,20
520	0,29	0,275	0,33	0,4	0,27
540	0,45	0,40	0,39	0,6	0,47
550	0,42	0,42	0,42	0,42	0,42
560	0,33	0,36	0,33	0,36	0,36
580	0,35	0,39	0,33	0,37	0,38
600	0,07	0,05	0,2	0,07	0,07

coelho se sensibilizariam mais pela LT do que os eritrócitos humanos. A origem da toxina tem influência na sensibilização das hemácias. Em outra palavras, na prova de IHR com hemácias de galinha e de coelho, embora tenha-se obtido 100% de concordância nos testes feitos com amostras de *E.coli* LT⁺ de origem humana, em relação às amostras de origem suína, as porcentagens de concordância foram visivelmente menores, ou seja, 75 e 66,7%, respectivamente.

Para explicar estes resultados, poderíamos aventar hipóteses, tais como, menor quantidade de receptores para a LT em hemácias de cobaia, ou ainda uma maior afinidade da LT de origem humana pelas hemácias de galinha e de coelho do que humanas. Todavia, quando se analisam as provas de IHR e HI, é mais plausível supor que as diferenças antigenicas, sabidamente existentes entre estas duas enterotoxinas (3), se tornem mais evidentes, momente se for levado em consideração que em todos os testes desenvolvidos neste trabalho, usou-se como antissoro a antitoxina colérica, que nas reações antígeno-anticorpo reage mais fortemente com a LT de origem humana do que com LT de origem suína (16).

Referências Bibliográficas

1. Banwell, J.G. & Sherr, H. - Effect of bacterial enterotoxins on the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 65:467-497, 1973.
2. Castro, A.F.P. de; Serafim, M.B.; Gomes, J.A. & Gatti, M.S.V. - Improvements in the passive immune haemolysis test for assaying enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 12:714-717, 1980.
3. Clements, J.D. & Finkelstein, R.A. - Demonstration of shared and unique immunologic determinants in enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 22:709-713, 1978.
4. Dallas, W.S. & Falkow, S. - Amino-acid sequence homology between cholera toxin and *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Nature (London)* 288:499-501, 1980.
5. Field, M. - Modes of action of enterotoxins from *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.*, 1:918-925, 1979.
6. Gill, D.M. & Enomoto, K. - Intracellular enzymic action of enterotoxins - The biochemical basis of cholera. In: Ouchterlony, O. & Holmgren, J. (eds), 45th Nobel Symposium Stockholm. Cholera and related diarrheas. S. Karger, Basel: p.104-114, 1980.
7. Gill, D.M.; Clements, J.D.; Robertson, D.C. & Filkenstein, R.A. - Subunit number and arrangement in *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Infect. Immun.*, 33:677-682, 1981.
8. Hansson, H.A.; Holmgren, J. & Svennerholm, I. - Ultrastructural localization of cell membrane GM1 ganglioside by cholera toxin. *Proc. Natl. Acad. Aci. (USA)*, 74:3782-3786, 1977.
9. Holmgren, J. - Comparison of the tissue receptors for *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* enterotoxins by means of gangliosides and natural cholera toxoid. *Infect. Immun.*, 8:851-859, 1973.
10. Holmgren, J.; Fredman, P.; Lindblad, M.; Svennerholm, A.M. & Svennerholm, L. - Rabbit intestinal glycoprotein receptor for *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin lacking affinity for cholera toxin. *Infect. Immun.*, 38:424-433, 1982.
11. Holmgren, J. & Lönnroth, I. - Structure and function of enterotoxins and their receptors. In: Ouchterlony and Holmgren, J. (eds), 43rd Nobel Symposium Stockholm. Cholera and related diarrheas, S. Karger, Basel, p.88-103, 1978.
12. Holmgren, J.; Lönnroth, I. & Svennerholm, L. - Tissue receptor for cholera exotoxin: postulated structure from studies with GM1 ganglioside and related glycolipidis. *Infect. Immun.*, 8:208-214, 1973.
13. Honda, T.; Tsuji, T.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - Immunological nonidentity of heat-labile enterotoxins from human and porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 34:337-340, 1981.
14. Lima, A.O. & Silva, W.D. da - Imunologia, Imunopatologia e Alergia. 19 ed. Rio de Janeiro Ed. Guanabara Koogan, S.A. 673p., 1970.

15. Pierce, N.F. - Differential inhibition effects of cholera toxoid and gangliosides in the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *J. Exp. Med.*, 137:1009-1023, 1973.
16. Ricci, L.C. & Castro, A.F.P. de - Indirect haemagglutination test for the detection of thermolabile (LT) enterotoxin from *Escherichia coli*. *Med. Microbiol. Immunol.*, 175:251-260, 1986.
17. Sack, R.B. - Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Identification and characterization. *J. Infect. Dis.*, 142:279-289, 1980.
18. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Leonardo, M.B. & Monteiro, A.R. - A single radial immune hemolysis (SRHI) test for the detection of thermolabile (LT) enterotoxins of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 14:473-478, 1981.
19. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P. de; Reis, M.H.L. & Trabulsi, L.R. - Passive immune haemolysis for detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from different sources. *Infect. Immun.*, 24:606-610, 1979.
20. Yano, T.; Oliveira, M.S.; Fontes, C.F.; Almeida, A.C.P. de & Castro, A.F.P. de - Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the radial immune haemolysis test: a modification for clinical use. *Med. Microbiol. Immunol.*, 171:171-178, 1982.
21. Wolk, M.; Svennerholm, A.M. & Holmgren, J. - Isolation of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by affinity chromatography-characterization of subunits. *Curr. Microbiol.*, 3:339-344, 1980.

SOME FEATURES ON THE GROWTH OF MICROCYSTIS AERUGINOSA KUETZ. EMEND. ELENKIN IN ASM-1 MEDIUM

Odécio Cáceres

& Armando Augusto Henriques Vieira

Recebido para publicação em 7/07/87

Deptº de Ciências Biológicas

Universidade Federal de São Carlos

Via Washington Luiz, Km 235

13560 São Carlos SP, Brasil

Summary

Some features on the growth of *Microcystis aeruginosa* were examined, following exposure of this organism to different culture conditions (light at 20°C, light at 4°C, dark at 20°C and dark at 4°C) in an attempt to simulate those encountered in natural environments. Experiments in which cultures were submitted to these conditions indicate that pH, redox potential, dissolved oxygen and cell division rate fluctuated much as was expected. Nevertheless, glycogen (energy reserve) tended to disappear from the cultures maintained in the darkness and under 0.5 Klux at 4°C, the glycogen content did not decrease. The glucose consumption rate was faster in the darkness and presented a smaller K_m , suggesting a higher affinity of *Microcystis* for external sources of glucose. This may have some significance in relation to the survival strategy of *Microcystis* under field conditions during autumn, winter and spring in temperate lakes.

Resumo

Alguns aspectos do crescimento de *Microcystis aeruginosa* Kuetz.
emend. Elenkin in ASM-1 medium

Alguns aspectos do crescimento de *Microcystis aeruginosa* foram examinados através da exposição desse organismo a diferentes condições de cultura (luz a 20°C, luz a 4°C, escuro a 20°C e escuro a 4°C) numa tentativa de simular aquelas prováveis situações encontradas no ambiente natural. Os experimentos realizados indicaram que pH, potencial redox, oxigênio dissolvido e taxa de divisão celular flutuaram muito além do esperado. Todavia, o glicogênio (energia de reserva) tendeu a desaparecer em culturas mantidas no escuro, enquanto que sob 0,5 Klux e 4°C o conteúdo de glicogênio não diminuiu. A taxa de consumo de glicose foi maior no escuro e apresentou menor valor de K_m , sugerindo maior afinidade da *Microcystis* para fontes exógenas de glicose. Isto pode ser importante em relação à estratégia de sobrevivência desse organismo sob condições naturais durante o outono, inverno e primavera em lagos temperados.

Introduction

Microcystis aeruginosa Kuetz. emend. Elenkin is one of characteristic organisms producing water blooms in tropical, subtropical and temperate freshwaters. However, the knowledge of precise mechanisms determining the occurrence of such blooms has not been clear until now. Recent researches have established that the familiar phases of vigorous increase, conspicuous populations maxima and surface bloom development are abruptly terminated by annually recurrent phases of "benthic overwintering" on the lake sediments (4, 14 and 15). There are different opinions about the mechanisms which could determine such water blooms: the raised pH and the diminishing fraction of aqueous carbon dioxide available for photosynthesis (9 and 15); the critical interaction between the attenuation of incident light and the physical stability of the water column (4, 10 and 12); the ability to tolerate, if not flourish under, conditions of low oxygen tension and low redox potential (3, 6 and 16); and the renewed growth from overwintering colonies of *Microcystis* is stimulated when bottom waters approach anoxia and light simultaneously penetrates to the deep sediments (2 and 14).

In this paper, the growth of *Microcystis* in defined culture medium is compared with such variables as pH, redox potential (Eh) and dissolved oxygen. Consideration is also given to variations in the rate of cell division to the cell contents of protein, carbohydrate, glycogen and chlorophyll and to the kinetics of glucose absorption under various conditions of light and temperature, in an attempt to simulate those of natural environments.

Material and Methods

Organism and growth conditions - The laboratory strain used in the study was *Microcystis* L 305, a non-axenic culture (but with an insignificant number of bacteria) first isolated by G.M. Jaworski from the plankton of Enclosure B-Blelham Tarn - Cumbria - England in 1977 and since maintained in colonial state in the modified ASM-1 medium (5 and 13).

This strain has been cultured in a thermostatically-controlled ($20 \pm 1^\circ\text{C}$) room (18) which was artificially illuminated (2Klux; 12h light: 12h dark).

Method of estimating cell concentration - 100ml aliquots of a well shaken sample or prepared suspension were placed in 100ml cylinder flasks, to which a single pellet (~0.3g) of sodium hydroxide was added. Smaller volumes of more dense suspensions were diluted with clean tapwater to 100ml. To ensure complete disruption of the more mucilaginous colonies, it was necessary to heat the alkaline suspension in a thermostatic oven for 30min. at 90°C (13), prior to microscopical counting in a Fuchs-Rosenthal Haemocytometer.

Analysis - The concentrations of anthrone-reactive carbohydrate, protein, glycogen, glucose and chlorophyll were respectively determined by colorimetric methods (1, 7, 8, 11 and 17). Dissolved oxygen concentration and redox potential (Eh) were measured directly during experiments using specific electrodes.

Experimental procedure - *Microcystis* was subcultured in 2 litres aliquots of mod. ASM-1 medium. The initial inoculum was 45×10^3 cells. ml^{-1} . After 14 days culture at 20°C , 12h light:12h dark and 2Klux of light intensity, the culture was divided into 4 subcultures each being then submitted to different ambient conditions, viz: 400ml (L 20) maintained under similar conditions (light at 20°C); 400ml (D 20) in darkness at 20°C ; 400ml (L 4) under continuous light (~0.5Klux) at 4°C ; and 400ml (D 4) in darkness at 4°C . The remaining 400ml were used during the first 14 days in determining pH, dissolved oxygen, Eh, total carbohydrate, glycogen, protein and chlorophyll contents and cell numbers in the subculture.

Results

The initial growth (in terms of cell concentration) of *Microcystis* in 2 \times subcultures and the subsequent growth in the experimental treatments are shown in

Figure 1A and B - Comparison of the *Microcystis* growth (cell number/ml and division rate d^{-1}) under various conditions: (○) light 20°C; (●) dark 20°C; (Δ) light 4°C and (▲) dark 4°C.

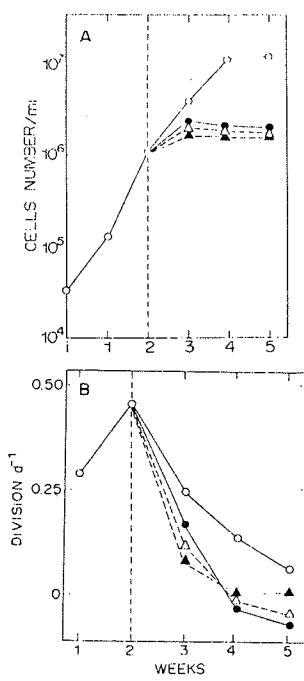


Figure 2A, B and C - Effect of different light and temperature conditions on pH, dissolved oxygen and redox potential (Eh) of the subcultures maintained at (○) light 20°C; (●) dark 20°C; (Δ) light 4°C and (▲) dark 4°C.

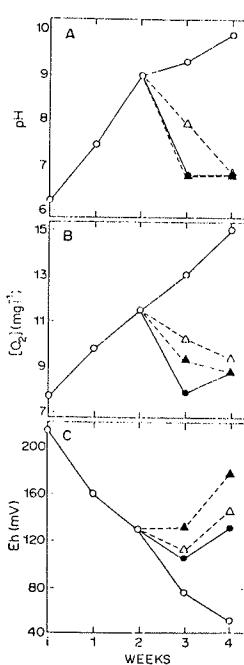


Figure 3 - Carbohydrate content during the *Microcystis* growth at different light and temperature conditions: (○) light 20°C; (●) dark 20°C; (Δ) light 4°C and (▲) dark 4°C.

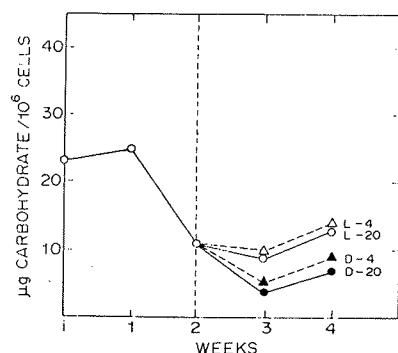
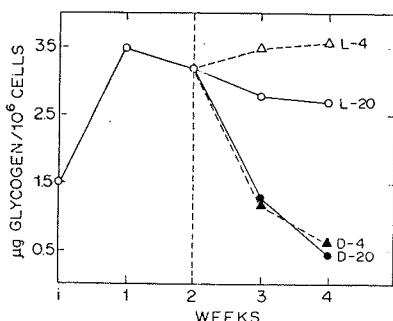


Figure 4 - Effectiveness of either light 20°C (○), dark 20°C (●), light 4°C (Δ) and dark 4°C (▲) on the glycogen content of *Microcystis*.

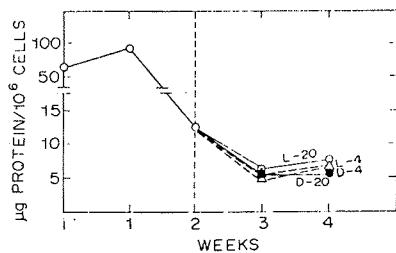


in the experimental treatments are shown in Fig. 1A and 1B respectively. As expected, the cell division rate was greatest (0.36 day^{-1}) between the second and third week, decreasing during the following weeks in the L 20 treatment. In the L 4, D 20 and D 4 treatments the cell division rate was immediately diminished (0.07 day^{-1}) and pH and dissolved oxygen levels decreased in all treatments except L 20, while redox potential (Eh) increased considerably (Fig. 2A, 2B and 2C).

The cell contents of carbohydrate (Fig. 3) and protein (Fig. 5) decreased at the end of exponential growth phases in all treatments and in similar ratios. However, glycogen, the probable storage material (energy reserve), tended to disappear in the cultures maintained in darkness but to remain unchanged in the illuminated treatments 4°C as 20°C (Fig. 4). The chlorophyll contents (Fig. 6) of cells in the D 20, L 4 and D 4 treatments were increased in relation to those of L 20 treatments, suggesting some physiological adaptation to compensate the inadequacy of light.

An interesting difference between the glucose absorption rates of *Microcystis* cells maintained for 9 days in darkness and of those maintained under natural

Figure 5 - Changes in the concentration of protein measured during 4 weeks at different temperatures and light conditions of the *Microcystis* subcultures. L-20 (o); D-20 (●); L-4 (Δ) and D-4 (▲).



photoperiod is shown in Fig. 7. The glucose absorption rate is faster in the former case and presents a smaller K_m (Michaelis-Menten Constant). This suggests a greater affinity for assimilable carbohydrate in darkness when *Microcystis* is depleted of glycogen. Similar results were obtained at 4°C. K_m is unchanged but glucose absorption rate is similar in darkness and light conditions.

Discussion

The results presented here corroborate some observations shown in a previous paper (2). Suitable irradiance and temperature conditions improve the photoautotrophic capacity of the organism growth period which normally occurs in the summer season. Although the cell division rate decreased after the second week, despite the persistence of suitable temperature and light conditions, it nevertheless exceeded those of treatments in poor or zero light and at the lower temperature. Morphologically, the *Microcystis* used in this work conformed with St.

V (14), the stage associated with summer vegetative growth.

The redox-potential behaviour is reciprocal to the oxygen production, decreasing in light culture, possibly because of high mucilage production, (19) which may contribute to the success of *Microcystis* growth in media saturated with oxygen. The raised redox potential in D 4, L 4 and D 20 cultures may be related to the reduction in the carbohydrate content.

Another important observation concerns glycogen storage during the higher-irradiation period. This glycogen can support a significant cell division (0.05 to 0.1 day^{-1}), in darkness for up to 7 days. In the presence of light (0.5 Klux) at 4°C, the glycogen content does not decrease. This may have some significance in relation to the survival strategy of *Microcystis* under field conditions, during autumn, winter and spring in temperate lakes. In other words, those *Microcystis* colonies that, under natural conditions sink to and survive on the sediment surface

Figure 6 - Comparison of chlorophyll content during the *Microcystis* growth at (o) light 20°C, (●) dark 20°C, (Δ) light 4°C and (▲) dark 4°C.

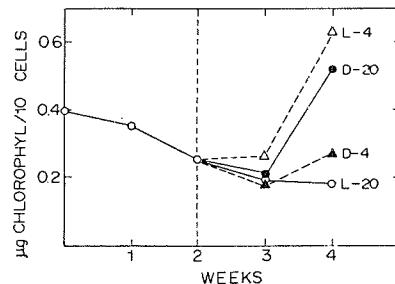
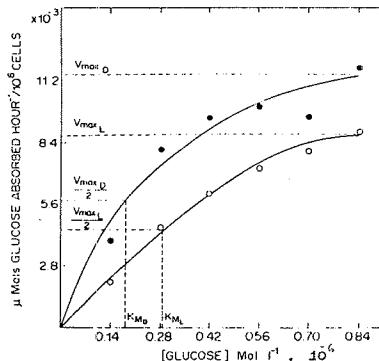


Figure 7 - Glucose kinetic absorption by *Microcystis* in dark and light at 20°C conditions.

Symbols: (o) glucose absorption at light and (●) glucose absorption at darkness.



for months or years without apparent division, may be sustained by a low light income. Temperature appears not to interfere with glycogen consumption between 4 and 20°C. In darkness, exhaustion of the glycogen store may take some 15 days. Under these circumstances the higher affinity of *Microcystis* for external sources of glucose in darkness could have some bearing upon its ability to survive, apparently heterotrophically during the autumn, winter and spring seasons on the mud surface of temperate lakes. It is necessary to investigate in the laboratory and through field experiments the behaviour of *Microcystis* in other stages of its life cycle.

Acknowledgements

We are grateful to Dr. C.S. Reynolds of the Freshwater Biological Association - Ferry House - England for stimulating discussion and critical review of the manuscript during his visit to our laboratory. This research was supported by grant number 80/400-3 from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo).

References

1. Ashwell, G. - Colorimetric analysis of sugars. Methods in Enzymology vol. III. Academic Press, pp. 85-86, 1957.
2. Cáceres, O. & Reynolds, C.S. - Some effects of artificially enhanced anoxia on the growth of *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenkin, with special reference to the initiation of its annual growth cycle in lakes. Arch. Hydrobiol. 99:379-397, 1984.
3. Ellof, J.N. - The absorption of oxygen from liquid cultures of blue-green algae by alkaline pyrogallol. J. Limn. Soc. Sth. Africa, 3:13-16, 1977.
4. Foy, R.H.; Gibson, C.E. & Smith, R.V. - The influence of day length, light intensity and temperature on the growth rates of planktonic blue-green algae. Br. Phycol. 11:151-163, 1976.
5. Gorham, P.R.; McLachlan, J.; Hammer, U.T. & Kim, W.K. - Isolation and culture of toxic strains of *Anabaena flos-aquae* (Lingb.) - Verh. Internat. Verein. Limnol. 15:769-780, 1964.
6. Gusev, M.V. - Effect of dissolved oxygen on the development of blue-green algae. Dokl. Akad. Nauk. USSR, 147:947-950, 1962.
7. Hassid, W.Z. & Abraham, S. - Chemical procedures for analysis of polysaccharides. Methods in Enzymology, vol. III. Academic Press, pp. 34-35, 1957.
8. Herbert, D.; Phillips, P.J. & Strange, R.W. - Chemical analysis of microbial cells. - In: Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (ed.). - Methods in Microbiology, p. 209-344. Academic Press, London, 1971.
9. Keenan, J.D. - Response of *Anabaena* to pH, carbon and phosphorus. J. Envir. Engng. Div. Am. Soc. Civ. Engrns. 99:607-620, 1973.
10. Kirk, J.T.O. - A theoretical analysis of the contribution of algal cells to the attenuation of light within natural waters. II. Spheric cells. New Phytol. 75:21-36, 1975.
11. Lowry, O.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, H.J. - Protein measurements with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275, 1951.
12. Reynolds, C.S. & Walsby, A.E. - Water-blooms. Biol. Rev. 50:437-481, 1975.
13. Reynolds, C.S.; Jaworski, G.H.M. - Enumeration of natural *Microcystis* populations. Br. Phycol. J. 13:269-277, 1978.
14. Reynolds, C.S.; Jaworski, G.H.M.; Cmiech, H.A. & Leedale, G.F. - On the annual cycle of the blue-green algae *Microcystis aeruginosa* Kuetz. emend. Elenkin Phil. Trans. R. Soc. London, B293:419-477, 1981.
15. Shapiro, J. - Blue-green algae: why they become dominant. Science, 179:382-384, 1973.

16. Sirenko, L.A.; Stetsenko, N.M.; Arendarchuk, V.V. & Kuzmenko, M.I. - Role of oxygen conditions in the vital activity of certain blue-green algae. *Microbiology*, 37:199-202, 1968.
17. Talling, J.F. & Driver, D. - Some problems in the estimation of chlorophyll a in phytoplankton. Proceedings, conference of primary productivity measurement, marine and freshwater, Hawaii 1961. U.S. Atomic Energy Comission TID-7633 pp. 142-146, 1963.
18. Vieira, A.A.H. - Métodos de cultura das algas do plâncton marinho: estudos realizados nas regiões de Cananéia e Ubatuba, SP. Bolm. Inst. Oceanogr. 26:303-338, 1977.
19. Weller, D.; Doemel, W. & Brock, T.D. - Requirements of low oxidation-reduction potential for photosynthesis in a blue-green alga (*Phormidium* sp.). *Arch. Microbiol.* 104:7-13, 1975.

MICROBIOTA TELÚRICA DE LATOSOLO VERMELHO-AMARELO, COM CULTURA DE MILHO (*ZEA MAYS*), TRATADO COM VINHAÇA, NO MUNICÍPIO DE RIO CLARO, SP *

Sânia Maria Tauk

Recebido para publicação em 7/07/87

Deptº de Ecologia

Instituto de Biociências, UNESP

Caixa Postal 178

13500 Rio Claro SP, Brasil

Resumo

Foi verificado o efeito da vinhaça adicionada em solo com cultura de milho, quanto a densidade de bactérias, actinomicetos, microrganismos crescidos em meios com sacarose, amido e carboximetil celulose (CMC), como única fonte de carbono. O número de microrganismos foi determinado pelo método indireto, utilizando-se a técnica de diluição em série e meios de cultura específicos para cada grupo analisado. As placas foram incubadas a 28°C por 48 horas para as bactérias e por seis dias para os demais grupos. Utilizou-se o teste de variância com um ou dois fatores e o limite da menor diferença para análise estatística. O efeito da vinhaça foi temporário, permanecendo durante 40 dias sobre a densidade dos microrganismos, com exceção para os actinomicetos que foi mais tardio. A vinhaça aumentou o número de bactérias e actinomicetos no solo e o adubo mineral acarretou acréscimo dos microrganismos capazes de crescer em meio com CMC ou amido, como única fonte de carbono. Os dois aditivos agrícolas não aumentaram o número dos microrganismos crescidos em meio com sacarose, como única fonte de carbono.

Summary

*Microflora in corn (*Zea mays*) crop, Red-Yellow Latosol sand phase, treated with vinasse in Rio Claro, State of São Paulo, Brazil*

The effect of the addition of vinasse in the corn field soil on the densities of bacteria, actinomycetes and microorganisms able to grow in culture media with sucrose, starch and carboxymethyl cellulose (CMC) as the only carbon source was analysed. The number of microorganisms was determined by the indirect method, using serial dilution plate method and specific culture media for each nutritional group analysed. The plates were incubated at 28°C for 48 hours for bacteria and six days for the other microorganisms. One for two-way analysis of variance and least significant difference tests were used for statistical analysis. The temporary effect of vinasse addition on microbial communities lasted 40 days, but was longer on actinomycetes. The vinasse which was added to soil increased the number of bacteria and actinomycetes while mineral fertilizer likewise increased the number microorganisms able to grow in culture media with CMC or starch as the only carbon source. However, none of the treatments

* Financiado pela FINEP

increased the number of microorganisms able to grow in culture media with sucrose as the only carbon source.

Introdução

A utilização da vinhaça como fertilizante não é recente, pesquisadores há muito citam a utilização da mesma como adubo em complementação à adubação mineral (3). A quantidade recomendada pode variar de acordo com o tipo de solo, do próprio resíduo e da cobertura vegetal (11). Os efeitos da vinhaça no solo dependem de vários fatores, sem considerar a possibilidade da interação dos mesmos, dificultando a interpretação dos resultados. O efeito da vinhaça sobre culturas tem sido estudado, por exemplo, em cana-de-açúcar (10, 13), feijão, milho e gergelin (17).

Foram desenvolvidos alguns estudos anteriores sobre a microbiota de solo tratado com vinhaça, sendo que em alguns casos, ocorreu aumento da densidade dos microrganismos (2, 4, 5). Entretanto, em solo sob cerrado, não foi observado aumento do número de bactérias e actinomicetos (9). Porém a vinhaça adicionada neste mesmo tipo de solo, aumentou significativamente os números de fungos capazes de crescer em meio com carboximetil-celulose, amido ou sacarose como única fonte de carbono (17).

Com o objetivo de verificar o efeito da adição de vinhaça na cultura de milho, foram estudados diversos parâmetros, dentre eles, alguns aspectos da microbiota télúrica, que são aqui abordados.

Material e Métodos

Em uma área da Fazenda São José, município de Rio Claro-SP, onde a cana-de-açúcar substituiu o cerrado há quatro anos atrás, após a retirada dessa cultura, o solo foi preparado para o plantio de milho, utilizando-se três tratamentos: vinhaça, 80m³/ha; adubo mineral-fórmula 5-30-20, 250kg/ha e testemunha. Estes tratamentos foram utilizados uma única vez e as parcelas correspondentes, no total de 12, foram distribuídas ao acaso, na área de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa.

Nestas parcelas não foram colocados herbicidas ou inseticidas ou ainda qualquer outro defensivo agrícola recomendado para cultura de milho. Porém na cultura anteriormente implantada, foram utilizados aditivos durante os quatro anos de permanência da mesma. Utilizou-se vinhaça do tipo de caldo misto, adicionada a quente por toda a extensão das parcelas, enquanto que o adubo mineral foi colocado somente nas soqueiras.

As coletas foram realizadas em diferentes épocas, tendo sido a primeira um dia após a retirada da cana-de-açúcar, em novembro de 1985. O plantio de milho foi realizado após um mês e quando a cultura se encontrava com 40, 70, 90 e 110 dias de idade, novamente foram coletadas amostras compostas de solo, até 15cm de profundidade, das linhas e das entre-linhas da cultura. O solo foi colocado em sacos plásticos, devidamente etiquetados e levados para o laboratório, onde as amostras foram passadas em peneira com malha de 2,83mm e homogeneizadas individualmente para o processamento imediato.

A densidade de microrganismos do solo foi determinada utilizando-se o método indireto, com técnica de diluição em série (6).

Dez gramas de solo (peso úmido) foram colocados em erlenmeyer de 250ml contendo 90ml de solução salina (NaCl 0,85%), com agitação durante 30 minutos, em temperatura ambiente. Os meios de cultura utilizados foram: agar nutritivo (12) para bactérias; ágar amido (7) para actinomicetos e meio mineral (12) com 2% de ágar acrescido de 0,5% de sacarose, amido ou carboximetil celulose, como única fonte de carbono. As placas de Petri foram incubadas a 28°C, durante 48 horas para as bactérias e 6 dias para os demais grupos de microrganismos.

A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de variância com um ou três fatores e o teste "LSD" limite da menor diferença (15).

Resultados e Discussão

A densidade de bactérias variou entre 5×10^8 a $3,6 \times 10^9$, durante a permanência da cultura de milho e foi superior, $1,5 \times 10^{10}$ no período anterior ao plantio do milho, isto é, em novembro de 1985, Figura 1. No solo com cultura de 40 dias, janeiro/1986, a adição de vinhaça acarretou aumento significativo ($F=34,3^{**}$) do número desses microrganismos, $3,2 \times 10^9$, em relação ao solo tratado com adubo mineral, $1,5 \times 10^9$, e o testemunha, $1,4 \times 10^9$, ao contrário do observado por outro autor (9). A adubação mineral não produziu este mesmo efeito. Nos demais períodos, não foi observada diferença estatisticamente significativa ($F=0,40$ n.s.) quanto aos tratamentos utilizados. Foi constatada diferença no número de bactérias em relação ao período de coleta do solo, ($F=44,84^{**}$), indicando que estes microrganismos estão sob ação de outros parâmetros presentes nos sistemas. O efeito do tratamento foi dependente do período de coleta e quanto às linhas e entre-linhas da cultura ($F=4,35^{**}$).

Os actinomicetos embora sendo bactérias, foram estudados separadamente em decorrência do importante papel que desempenham no solo. O número foi maior antes do plantio de milho, $9,0 \times 10^7$, diminuindo com instalação dessa cultura, sendo que a densidade durante o período de estudo variou entre $1,5 \times 10^7$ a $4,8 \times 10^7$, Figura 2. A adição de vinhaça acarretou acréscimo ($F=3,70^*$) do número de actinomicetos, principalmente no mês de janeiro e no mês de março, em relação ao solo testemunha ($F=9,91^*$; $LSD=1,55^*$) ao contrário do observado em solo sob cerrado (9). O adubo mineral não acarretou este mesmo efeito ($LSD=-0,40$ n.s.). Houve variação quantitativa das amostras coletadas nas linhas e nas entre-linhas da cultura ($F=6,72^*$), porém não quanto aos períodos de coletas ($F=0,79$ n.s.). Foi demonstrado estatisticamente que as alterações acarretadas pelos diferentes tratamentos dependeram do período das coletas ($F=4,44^{**}$). Estes

Figura 1 - Número de bactérias, até 15cm de profundidade de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (□) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho

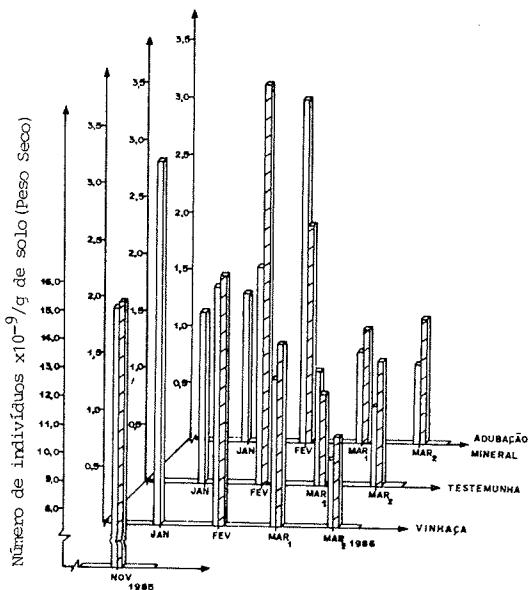
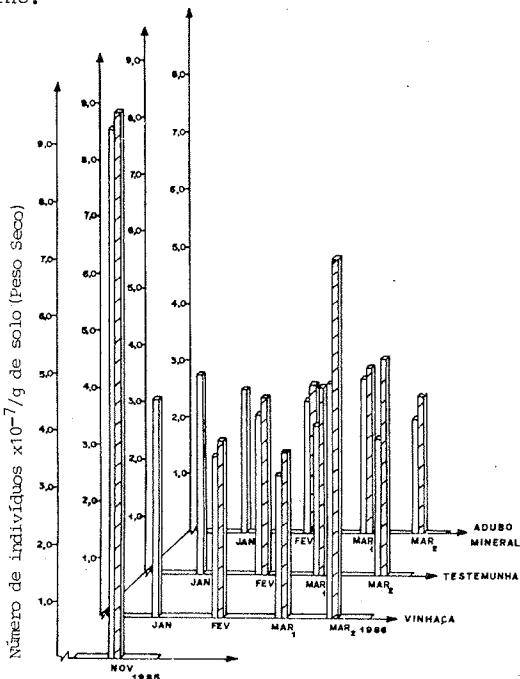


Figura 2 - Número de actinomicetos, até 15cm de profundidade de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa das linhas (□) e entre-linhas (▨) da cultura de milho.



mesmos efeitos não foram verificados para os fungos nas mesmas amostras de solo (16).

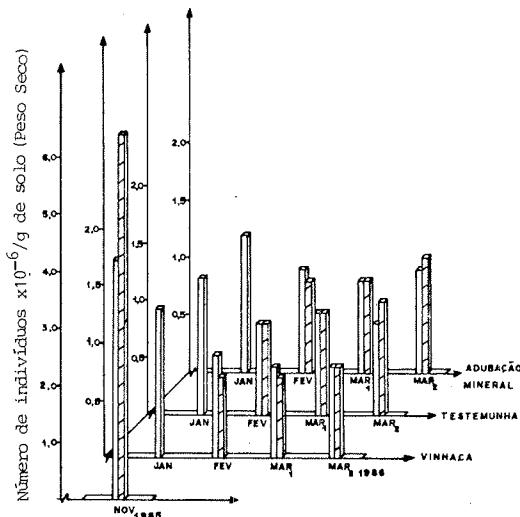
Os microrganismos capazes de crescer em meio contendo sacarose, como única fonte de carbono tiveram densidade entre $5,0 \times 10^5$ e $1,2 \times 10^6$ no solo da cultura de milho e não sofreram qualquer alteração estatisticamente significativa quanto aos diferentes tratamentos ($F=1,47$ n.s.) ou quanto ao período de coletas ($F=0,70$ n.s.) e ainda quanto às linhas e entre-linhas da cultura ($F=0,96$ n.s.), Figura 3.

Os microrganismos capazes de crescer em meio contendo amido, como única fonte de carbono tiveram densidade entre $7,0 \times 10^5$ a $1,6 \times 10^6$, sofreram, em janeiro, alteração estatisticamente significativa ($F=4,40^*$) da mesma com adição do adubo mineral, porém não em relação à vinhaça ($F=2,61$ n.s.). Nos demais períodos verificou-se que os tratamentos acarretaram alterações na densidade desses microrganismos dependentes do período da realização das coletas ($F=7,24^*$) ou quanto às linhas e entre-linhas, também dependendo do período ($F=4,58^*$), Figura 4.

A variação da densidade dos microrganismos capazes de crescer em meio contendo carboximetil-celulose, como única fonte de carbono, durante o cultivo de milho, foi entre $4,4 \times 10^5$ a $1,1 \times 10^6$, Figura 5. Verificou-se que a adição do adubo mineral, aumentou a densidade desses microrganismos, somente em janeiro ($F=11,22^{**}$), entretanto este efeito não foi observado para os demais períodos de coleta ($F=0,31$ n.s.), apenas o número desses microrganismos variou com este último fator ($F=13,13^{**}$).

De modo geral, os tratamentos utilizados acarretaram efeito temporário sobre a densidade da microbiota estudada, com exceção dos actinomicetos que apresentaram acréscimo somente após três meses e meio da aplicação da vinhaça ou do adubo mineral. Estes microrganismos já foram estudados em solo sob cerrado tratado com vinhaça, sendo observado que doses de $20\text{t}/\text{m}^2/\text{ano}$ aplicadas durante dois anos consecutivos, acarretaram aumento

Figura 3 - Número de microrganismos capazes de crescer em meio contendo sacarose, como única fonte de carbono, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (■) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.



temporário no número de bactérias, porém com um ligeiro decréscimo dos actinomicetos (9).

No solo sob cerrado tratado durante cinco anos com vinhaça, em doses de $20\text{L/m}^3/\text{ano}$ e nos dois últimos anos com $50\text{L/m}^3/\text{ano}$, o resíduo acarretou acréscimo do número de microrganismos capazes de crescer em meio com sacarose, amido ou carboximetil-celulose, como única fonte de carbono (17), fato este não observado para todos os grupos no solo sob cultura de milho. Entretanto, em ambos, o efeito do resíduo foi temporário.

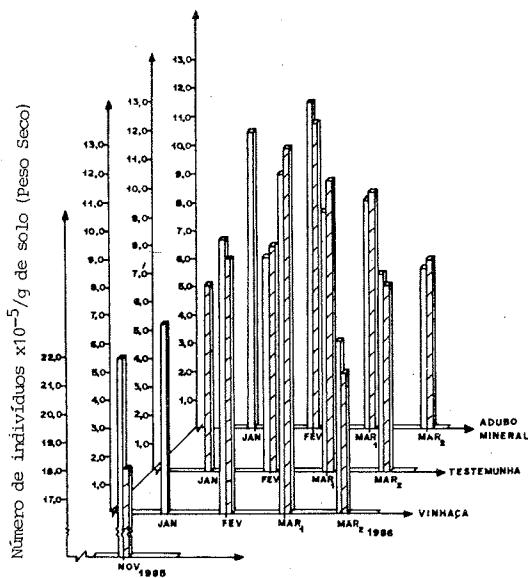
O número de bactérias em solo sob cerrado foi menor, $2,0 \times 10^7$ a $9,0 \times 10^9$ (16), em relação ao solo cultivado. Estas diferenças podem ser consequências de diversos fatores ambientais presentes nos dois sistemas, considerando que a metodologia utilizada foi a mesma.

O número de actinomicetos foi menor para o solo sob cerrado, $5,7 \times 10^4$ a $3,1 \times 10^6$ (16) em relação ao milho, Figura 2. Em outro tipo de cerrado foi encontrado um número elevado de actinomicetos, adaptados às condições de acidez, inclusive superando o número de bactérias (8).

Em relação ao solo de cultivo de milho, o número de microrganismos capazes de crescer em meio com carboximetil-celulose ou sacarose como única fonte de carbono foi maior no solo sob cerrado respectivamente, entre $8,0 \times 10^5$ a $7,0 \times 10^6$ e $7,0 \times 10^5$ a $7,5 \times 10^6$ (17) ao contrário do observado para as bactérias, actinomicetos e os microrganismos capazes de crescer em amido, como única fonte de carbono.

Solos cultivados podem apresentar número maior de microrganismos (1) mas, este fato é dependente do sistema de manejo do solo e do grupo de microrganismo estudado.

Figura 5 - Número de microrganismos capazes de crescer em meio contendo carboximetil celulose, como única fonte de carbono, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (□) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.



Referências Bibliográficas

- Alexander, M. - *Introduction to soil microbiology*. New York, John Wiley & Sons, 1977.
- Almeida, M.T. de. - *Decomposição da vinhaça incorporada ao solo (Evolução de CO₂ e formação da biomassa microbiana) e destino da complementação nitrogenada*. Piracicaba, ESALQ, 1983. (Dissertação de Mestrado).
- Arruda, H.C. de. - *Aplicação econômica da vinhaça na adubação de cana-de-açúcar*. Bol. Inst. Agron. de Campinas, 144:27, 1957.
- Caldas, H.E. - Os fenômenos microbiológicos nos solos tratados com caldas de destilaria. Bol. Técn. Inst. Agron. Nordeste, Recife, 10:41-82, 1960.
- Camargo, R. de. - O desenvolvimento da flora microbiana nos solos tratados com vinhaça. Análise Quantitativa. Bol. Inst. Zimotécn., ESALQ, Piracicaba, 9:1-44, 1954.
- Clark, F.E. - Agar-plate method for total microbial count. In: *Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties*. Madison, American Society of Agronomy, 1965, p. 1460-1466.

- 7.Coelho, R.R.R. - Ocorrência de actinomicetos em solos de cerrado, capazes de utilizar compostos aromáticos. Rio de Janeiro, 1976 (Dissertação de Mestrado).
- 8.Coelho, R.R.R. & Drozdowicz, A. - The occurrence of actinomycets in a cerrado soil in Brazil. Rev. Ecol. Biol. Sol., 15(4):459-473, 1978.
- 9.Costa, S.M. da. - Efeito da adição da vinhaça na microflora do solo de cerrado, da região de Corumbataí, SP. Rio Claro, UNESP, 1983 (Dissertação de Mestrado).
- 10.Glória, N.A. da. - Uso de resíduos de destilação na agricultura. In: Informações técnico-científicas da Sociedade Brasileira Microbiologia - Fermentações Industriais & Transformações Microbianas no Solo. São Paulo, 1980, p.79-84..
- 11.Guimarães, E.; Betke, E.G. & Bassiolo, J.L. - Determinação da dose econômica da vinhaça na adubação da cana-de-açúcar. O solo, Piracicaba, LX:87-91, 1968.
- 12.Larpent, J.P. & Larpente-Gourgaud, M. - Microbiologia prática. São Paulo, Ed. Edgard Blucher, 1975.
- 13.Mazza, J.A. - Variações em algumas propriedades de solos com cana-de-açúcar (*Saccharum* ssp.) tratados com doses maciças de vinhaça. Piracicaba, ESALQ, 1985 (Dissertação de Mestrado).
- 14.Ranzini, G.; Brasil Sobral, M.O.C. do.; Malavolta, E. & Coury, T. - Vinhaça e adubos minerais I. Anais da ESALQ, Piracicaba, 10:97-108, 1953.
- 15.Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. - Biometry. San Francisco, W.H. Freeman, 1969.
- 16.Tauk, S.M. - Efeito de doses cumulativas de vinhaça em algumas propriedades do solo sob cerrado e do solo de culturas de milho e cana-de-açúcar nos municípios de Corumbataí e de Rio Claro, SP., Rio Claro, UNESP, 1987 (Tese de Livre Docência).
- 17.Tauk, S.M. & Ruegger, M.S. - Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça, no município de Corumbataí, SP. Rev. Microbiol., 18:67-76, 1987.

COMPARAÇÃO DO STAPHY-TEST E O TESTE DE COAGULASE EM TUBO, NA IDENTIFICAÇÃO DE AMOSTRAS PATOGÊNICAS DE ESTAFILOCOSIS DE ORIGEM ANIMAL

Maria Silvia Viccari Gatti
Antonio Fernando Pestana de Castro
& Natalícia Hifumi Hara

Recebido para publicação em 3/08/87

Deptº de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas
13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

Setenta e cinco amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de bovinos e suínos foram estudadas comparativamente pela prova de coagulase em tubo e pelo Staphy-Test. Na primeira foram usados plasmas de origem humana, bovina e de coelho, considerando-se como reação positiva a produção de fibrina em pelo menos um dos plasmas. Onze (14,66%) amostras foram negativas em ambos os testes, sendo considerados como estafilococos não patogênicos. As demais amostras, num total de 64 (85,33%), sendo 18 de origem bovinâ e 46 de origem suína, foram enquadradas como estafilococos patogênicos por terem sido positivas na prova de coagulase em tubo e/ou no Staphy-Test. Para a prova de coagulase em tubo foi verificado que a origem do plasma a ser utilizado influiu nos resultados obtidos, principalmente em relação às amostras de origem suína, que apresentaram um maior número de resultados falso-positivos quando se usou plasma bovino. Para as amostras bovinas, os plasmas usados tiveram comportamento semelhante, sendo aparentemente superiores os de origem bovina e de coelho. Os resultados da comparação da prova de coagulase em tubo com o Staphy-Test revelaram, para as amostras bovinas e suínas, respectivamente, correlações de positividade a 94,4% e 89,1%. Entre as primeiras, das 18 amostras estudadas, apenas 1 (5,55%) foi negativa no Staphy-Test. Em relação às amostras suínas, 3 (6,53%) foram negativas no Staphy-Test, embora positivas em prova de coagulase em tubo. Duas (4,34%) outras amostras apresentaram resultado inverso. Os dados obtidos na presente pesquisa, quando comparados a outros testes comerciais rápidos para a detecção do "clumping factor" permitem recomendar o Staphy-Test para estudos epidemiológicos ou de rotina laboratorial, na identificação rápida de amostras patogênicas de estafilococos de origem bovina e suína.

Summary

Comparative evaluation of the Staphy-Test and the tube coagulase test for the identification of pathogenic staphylococci from animal sources

Seventy-five strains of *Staphylococcus* sp., isolated from bovine and porcine, were studied comparatively through the tube coagulase test and the Staphy-Test. In the former, human, bovine and rabbit plasma were used, being considered as a positive reaction

the production of fibrin in at least one of the plasma. Eleven (14.66%) strains were negative in both tests and were taken as non-pathogenic staphylococci. The remaining 64 (85.33%) strains, being 18 from bovine and 46 from porcine, were grouped as pathogenic staphylococci, on account of their results in the tube coagulase test and/or the Staphy-Test. With regard to the tube coagulase test it was observed that the origin of the plasma used interferes significantly with the results to be obtained, mainly in relation to porcine strains, which showed a high number of false-positive, if bovine plasma were used in the reaction. As to the bovine strains, the different plasma used had a similar behaviour, being slightly superior the bovine and rabbit plasma. The results of the comparison between the tube coagulase test and the Staphy-Test revealed for the bovine and porcine strains positive correlations of 94.4% and 89.1%, respectively. Among the former ones, only 1 (5.55%) out of 18 strains was negative in the Staphy-Test. With regard to the latter strains, 3 (6.53%) were negative in the Staphy-Test though coagulase-positive. Conversely, 2 (4.34%) other strains showed opposite reactions. The data obtained in this research, when compared with those from other commercial rapid tests for the clumping factor, recommend the use of the Staphy-Test in either epidemiological surveys or laboratorial routine work for the quick identification of pathogenic staphylococci from bovine and porcine origins.

Introdução

À semelhança do que ocorre no homem, os animais domésticos são alvo de várias infecções piogênicas por amostras de estafilococos, identificadas, sobretudo, pela prova de coagulase em tubo, além de outras características discriminadas na Tabela 1, de acordo com Carter (3).

A espécie *S. saprophyticus*, tida como importante em infecções urinárias em mulheres (9), embora possa ser também isolada de espécimes de origem animal, carece de estudos mais detalhados para esclarecer seu possível papel como patogênica (3). O *S. epidermidis*, considerado como não patogênico é, na realidade, uma bactéria oportunista, tendo sido isolada, eventualmente, de casos de mastites em vacas e lesões cutâneas em várias espécies animais e no homem (3). Se a patogenicidade destas duas espécies de estafilococos em relação aos animais domésticos é passível de discussão, o mesmo não acontece, evidentemente com o *S. aureus* e, em especial, no que concerne, ao *S. intermedius* e *S. hyicus* (3). O primeiro tem sido isolado com frequência de casos de infecções piogênicas, principalmente em cães, pombos, cavalos e bovinos (8). Algumas amostras desta espécie não coagulam plasma humano, dando porém uma prova de coagulase positiva quando se usa plasma de coelho ou bovino (6). O *S. hyicus* acomete principalmente bovinos e suínos, causando uma dermatite exsudativa, poliartrite e, não raro, mastite em gado leiteiro (3).

Conforme se pode depreender da Tabela 1, as amostras de estafilococos de interesse em patologia veterinária, podem ser diferenciadas das não patogênicas pela prova de coagulase em tubo, embora o *S. hyicus* possa apresentar poucas amostras negativas neste teste. O teste de coagulase em tubo, a par de sua sensibilidade e especificidade leva contudo, de 4 a 24 horas para mostrar resultado confiável (1, 4, 6), motivo pelo qual, vários outros testes, tais como o Staphy Aurex (Wellcome Lab.), o SeroSTAT (Scott Lab. Inc., Fiksville, R.I.), Very-Staph (Zeus Technologies, Raritan, N.J.), Bacto-Staph (Difco Lab. Detroit, Michigan) e o Hemastaph (Remel, Lenexa, Kans) têm sido comparados em relação às cepas de origem humana, quanto à produção de coagulase, seja por meio da prova em lâmina ("clumping factor") ou da prova em tubo (7). A sensibilidade de tais testes, com raras exceções, tem demonstrado para as amostras de *S. aureus* de origem humana alto grau de correlação com a prova de coagulase em tubo (1, 2, 4).

Recentemente, com tecnologia nacional (Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos

Ltda.), foi desenvolvido o Staphy-Test, cujo princípio é bastante semelhante ao do Hemastaph (1) que se baseia na utilização de hemácias de carneiro sensibilizadas com fibrinogênio. A reação é feita em lâmina e as amostras produtoras de coagulase (clumping factor) promovem a transformação do fibrinogênio adsorvido às hemácias em fibrina, causando rápida aglutinação destas. As mesmas considerações já feitas quanto ao uso da prova de coagulase em tubo, na identificação de *S. aureus* de origem humana, se aplicam às amostras patogênicas de estafilococos de origem animal, independentemente das espécies a serem consideradas, ou sejam: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, uma vez que todas dão positividade na prova de coagulase em tubo (3).

Ao que consta, o Staphy-Test, apesar de sua comprovada eficiência na identificação de *S. aureus* de origem humana, não foi devidamente analisado em relação às amostras de origem animal. Portanto, o propósito da presente pesquisa foi avaliar o Staphy-Test, trabalhando com amostras de estafilococos de origem bovina e suína e comparando os resultados obtidos com aqueles fornecidos pela prova de coagulase em tubo, realizada, simultaneamente, com plasmas de origem humana, bovina e de coelhos.

Material e Métodos

Amostras - Foram estudadas 75 amostras de *Staphylococcus* sp. das quais 56 eram de origem suína (cedidas pela Profª Dra. Cláudia E. Pires Campos, Departamento de Microbiologia, UNESP, Campus de Botucatu) e 19 de origem bovina (fornecidas pela Profª Dra. M. Lúcia C. Araújo, Departamento de Microbiologia e Imunologia, UNESP, Campus de Jaboticabal). Duas amostras da coleção de bactérias do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, uma de *S. aureus* e outra de *S. epidermidis* foram incluídas como amostras padrão, para avaliação comparativa dos testes de coagulase em tubo e o Staphy-Test. Durante a realização do trabalho, estas amostras foram mantidas em ágar simples inclinado e ao abrigo da luz.

Plasmas - Foram utilizados plasmas de origem humana, bovina e de coelho. Para obtenção dos plasmas humano e de coelho foi usado como anticoagulante EDTA na concentração de 200M/ml de sangue (7), e para o plasma bovino, a solução de Alsever na proporção de 1:1, em relação ao volume de sangue coletado. Os plasmas obtidos foram divididos em aliquotas de 2ml e mantidos a -25°C até o momento do uso.

Cultivo - Para o teste de coagulase em tubo as amostras de *Staphylococcus* sp. de origem animal e as amostras padrão de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram cultivadas em caldo simples a 37°C por 18 horas (7). Para o Staphy-Test, as amostras foram cultivadas em ágar simples na mesma temperatura, porém por 24 horas.

Prova de coagulase em tubo - Foi realizada conforme as recomendações de Mac Faddin (7). A observação da presença de coágulos de fibrina, nos intervalos de tempo de 30, 60, 120 e 240 minutos, foi considerada como reação positiva. Nos casos em que não houve formação de coágulo nas primeiras 4 horas, os tubos foram mantidos nas mesmas condições por 24 horas, quando a leitura era repetida. Se após esta conduta, o plasma continuava liquefeito a reação foi considerada como definitivamente negativa. Ao contrário, a formação de coágulo depois desta incubação adicional, caracterizava uma reação positiva para a produção de coagulase.

Staphy-Test - Para a realização deste teste foram observadas as recomendações dos fabricantes (Probac do Brasil - Produtos Bacteriológicos Ltda.), com exceção do meio do cultivo, sendo utilizado o ágar simples para a obtenção de 2-3 colônias a serem homogeneizadas em lâmina com os reativos Staphy-Test R e Staphy-Test C. De acordo com as instruções, a leitura do teste foi feita no tempo de 15 a 30 segundos. Considerou-se como produtoras de coagulase ("clumping factor") as amostras de *Staphylococcus* sp. de origem animal que foram capazes de aglutinar as hemácias do reativo Staphy R, mas não do Staphy C. Tanto na prova de coagulase em

tubo, como no Staphy-Test, as amostras padrão de *S. aureus* e *S. epidermidis* foram sempre incluídas como controle das reações.

Resultados e Discussão

Convencionamos denominar de estafilococos patogênicos as amostras de origem animal que apresentaram a prova de coagulase em tubo positiva em pelo menos um dos plasmas ou que deram prova de Staphy-Test positiva. Tal critério se prende ao fato de que entre as amostras de estafilococos patogênicas para animais ocorrem outras espécies também coagulase positivas, conforme descrito na Tabela 1. Ao contrário, as amostras de estafilococos negativas em ambos os testes foram considerados como estafilococos não patogênicos. Os resultados da prova de coagulase em tubo com 75 amostras de *Staphylococcus* sp de origem bovina e suína se acham na Tabela 2.

Tabela 1 - Características das amostras de Estafilococos isoladas de animais domésticos (a).

Símbolos: a = Segundo Carter G.R. (3); b = Amostras de origem aviária podem ser negativas; c = Maioria das amostras positivas. Algumas com resultados negativos.

Espécie	Prova						
	Coagulase	Hemólise	Pigmento	Maltose	Manitol	DNAse	Novobiocina
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	+	+	(b)
<i>S. epidermidis</i>	-	-/+	±	+	-	-	S
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	±	+	±	-	R
<i>S. intermedius</i>	+	+	-	+	±	±	S
<i>S. hyicus</i>	±(c)	-	-	-	-	+	S

Tabela 2 - Distribuição das amostras de Estafilococos de origem suína e bovina segundo os resultados dos testes de coagulase em tubo e Staphy-Test.

Origem	Amostras	Nº de Amostras	Teste em tubo plasma			Staphy-Test	
			Humano	Bovino	Coelho	Reação	Controle
Suína	Estafilococos patogênicos	8	+	+	+	+	-
		30	+	-	+	+	-
		1	+	-	-	+	-
		2	+	-	+	-	-
		2	-	-	-	+	-
		1	-	+	+	+	-
		1	-	+	+	-	-
		1	-	-	+	+	-
Bovina	Estafilococos não patogênicos	10	-	-	-	-	-
		17	+	+	+	+	-
	Estafilococos patogênicos	1	-	+	+	-	-
		1	-	-	-	-	-
	Estafilococos não patogênicos	1	-	-	-	-	-

Verifica-se que o comportamento dos diferentes plasmas não foi homogêneo, na dependência da origem da amostra. Assim sendo, em relação às 18 amostras de estafilococos patogênicos de origem bovina, a prova de coagulase em tubo foi positiva para todas, quando utilizamos plasmas bovino e de coelho, enquanto o uso

do plasma humano deu resultado negativo para 1 das amostras. Apesar do pequeno número de amostras examinadas, este resultado sugere que para as amostras bovinas o teste de coagulase deve ser feito com plasma homólogo ou de coelho. No que tange às amostras de estafilococos patogênicos de origem suína, o comportamento dos plasmas de diferentes origens foi mais heterogêneo. Assim, verifica-se que o plasma de origem bovina foi capaz de detectar apenas 10 (21,73%) das amostras que foram positivas com plasma humano ou de coelho, sendo este último aparentemente mais eficiente (Tabela 2). Estes resultados sugerem que, em se tratando de amostras de *Staphylococcus* sp de origem suína e bovina, a identificação das mesmas como patogênicas, com base na prova de coagulase, requer cuidados especiais na escolha do plasma a ser utilizado.

Ao contrário das amostras de estafilococos patogênicos de origem animal, os *S. aureus* de origem humana dão sempre resultados positivos na prova de coagulase, quando se usa plasma homólogo ou de coelho (6).

Vejamos agora uma comparação dos resultados obtidos no Staphy-Test e prova de coagulase, para amostras de estafilococos de origem suína e bovina (Tabelas 2 e 3). Saliente-se em primeiro lugar que, entre as amostras não patogênicas de estafilococos de origem animal, num total de 11, houve 100% de correlação entre ambas as provas, demonstrando portanto que o Staphy-Test é extremamente seguro não ocorrendo reações falso-positivas. O mesmo não aconteceu na prova de coagulase, conforme exposto acima, na dependência da origem da amostra e do plasma utilizado na realização da mesma.

Tabela 3 – Distribuição das amostras de Estafilococos de origem suína e bovina de acordo com os resultados conjuntos dos testes de coagulase em tubo e Staphy-Test.

Amostras	Origem amostras	Nº de amostras	Nº (%) de am(+) no teste em tubo, em pelo menos um dos plasmas utilizados e (+) no Staphy-Test	Nº (%) de am(+) no teste em tubo, em pelo menos um dos plasmas utilizados e (-) no Staphy-Test	Nº (%) de am(-) no teste em tubo nos 3 plasmas utilizados e (+) no Staphy-Test	Nº (%) de am(-) no teste em tubo e (-) no Staphy-Test
Estafilococos patogênicos	Bovina	18	17 (94,43)	1 (5,55%)	0	0
	Suína	46	41 (89,13%)	3 (6,52%)	2 (4,34%)	0
Estafilococos não patogênicos	Bovina	1	0	0	0	1 (100%)
	Suína	10	0	0	0	10 (100%)

Ressalte-se, entretanto, que duas amostras de origem suína (Tabela 2) foram positivas na Staphy-Test e negativas na prova de coagulase, precisando ser melhor investigadas. Porem, dentro da conduta por nós adotada, foram consideradas como patogênicas.

Em relação às amostras de estafilococos patogênicos de origem bovina, 17 (94,44%) apresentaram resultados positivos em ambas as provas (Tabela 3), sendo que 1 (5,55%) das amostras negativas com plasma humano, porém positiva com plasma bovino e de coelho, foi também negativa no Staphy-Test. Os resultados da Tabela 3 mostram que a correlação de resultados positivos nos dois testes foi de 94,4%. Das 46 amostras de origem suína, consideradas como estafilococos patogênicos, apenas 3 (6,52%) foram negativas no Staphy-Test, encontrando-se 41 (89,13% ≈ 90%) positivas nos dois testes.

Duas amostras (4,34%) foram positivas apenas no Staphy-Test.

Apesar de raros resultados negativos no Staphy-Test feito com amostras de estafilococos patogênicos de origem animal, as frequências de correlação de positividade entre a prova de coagulase em tubo e o Staphy-Test são compatíveis com os encontrados para outros testes de identificação rápida de amostras de *S. aureus* de origem humana. Assim, com amostras desta origem encontra-se na literatura que para o Very-Staphy, Hemastaph, SeroSTAT e Bacto-Staph testes, as correlações com a prova de coagulase em tubo foram respectivamente: 99,2%; 93,2%; 91,5% e 90,7% (1, 2, 4).

Diante dos resultados obtidos e considerando-se a facilidade de comercialização do Staphy-Test somos da opinião que o mesmo é altamente recomendável para laboratórios que se dedicam à identificação de estafilococos patogênicos de origem animal.

Agradecimentos

À técnica Mirtis Maria Giaciani Ferraz, nossos agradecimentos pela assistência técnica prestada durante a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Berke, A. & Tilton, R.P. - Evaluation of rapid coagulase methods for the identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 23:916-919, 1986.
2. Brown, W.J. - Comparison of a yellow latex reagent for the identification of *Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 23:640-642, 1986.
3. Carter, R.G. - Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology. Ed. Charles e Thomas U.S.A. 515pg., 1984.
4. Essers, L. & Radebold, K. - Rapid and reliable identification of *Staphylococcus aureus* by a latex agglutination test. J. Clin. Microbiol. 12:641-643, 1980.
5. Lima, A.O. & Silva, W.D. - Imunologia, Imunopatologia, Alergia - Métodos 1^a Ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 673pg., 1970.
6. Joklik, W.K., Willet, P.H. & Amos, B.D. - Zinsser Microbiologia, vol. 1, 18 Ed. Editorial Médica Panamericana, 746pg., 1984.
7. MacFaddin, J.F. - Biochemical tests for identification of medical bacterial 2^a Ed., Willians & Wilkins, 527pg., 1980.
8. Topley and Wilson's - Principles of bacteriology, virology and immunity. Volume 2, 7^a Ed. Edward Arnold, 555pg., 1984.
9. Trabulsi, L.R. - Microbiologia, 1^a Ed. Livraria Atheneu, Rio de Janeiro, 355pg., 1986.

ESTUDO BACTERIOLÓGICO SEMI-QUANTITATIVO DE PONTAS DE CATÉTERES ENDOVENOSOS

Dulciane Maria de Magalhães Queiroz
 & Edilberto Nogueira Mendes

Recebido para publicação em 27/08/87

Laboratório de Pesquisa em Bacteriologia
 Deptº de Clínica Médica
 Faculdade de Medicina
 Universidade Federal de Minas Gerais
 Av. Alfredo Balena, 190
 30130 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

Setenta e seis catéteres endovenosos retirados de setenta e seis pacientes internados no Hospital das Clínicas/UFGM foram cultivados, empregando-se técnicas semi-quantitativas. Vinte e seis delas exibiram um crescimento igual ou superior a 15 colônias por placa (34,21%). Neste grupo, *Klebsiella pneumoniae* foi o microrganismo mais frequentemente isolado (23,33%). No grupo de catéteres com crescimento entre 1 e 14 colônias por placa predominou o *Staphylococcus epidermidis* (50,00%). Seis pacientes com cultura de catéter positiva apresentaram também hemoculturas positivas, tendo sido isolados nestes casos, os mesmos microrganismos do sangue e do catéter. Nenhum catéter com crescimento de 1 a 14 colônias por placa associou-se à bacteremia ($P < 0,001$). Foram ainda executados testes de suscetibilidade a antimicrobianos das amostras isoladas.

Summary

Semiquantitative culture of intravenous catheters

Semiquantitative cultures were done on 76 intravenous catheters from 76 patients. Twenty six catheters yielded 15 colonies or more. *Klebsiella pneumoniae* was the most common microbial isolate found on 7 of the 26 catheters positive on semiquantitative culture. Six of the twenty six catheters positive on semiquantitative culture were associated with septicemia. None of the catheters that were negative on semiquantitative culture resulted in septicemia. Results of antimicrobial susceptibility testing of isolated strains are reported.

Introdução

Várias complicações estão associadas ao uso de catéteres, tendo sido estimado que 1 a 8% de todas as cateterizações endovenosas resultam em bacteremias (11).

Na tentativa de avaliar o risco de desenvolvimento de septicemia decorrente de canulação do sistema venoso, Maki & Col. (8) preconizaram o emprego da técnica de cultura semi-quantitativa de pontas de catéteres endovenosos. Este método fornece dados muito mais preditivos de infecção local e septicemia secundária que as culturas rotineiras, pois permite distinguir catéteres colonizados de catéteres contaminados. Os catéteres colonizados (crescimento igual ou superior a 15 colônias de microrganismos por placa) estão intimamente associados a infecções no sítio de inserção e a bacteremias (8).

Nos Estados Unidos, aproximadamente 25.000 pacientes/ano apresentam complicações relacionadas ao uso de catéteres endovenosos (8). No Brasil trabalhos referentes ao assunto são escassos (4, 5) e há relato de somente um estudo com análise bacteriológica semi-quantitativa, no qual, entretanto, foram incluídos apenas 30 pacientes (5). Estes fatos nos motivaram a desenvolver um estudo microbiológico semi-quantitativo de pontas de catéteres endovenosos retirados de pacientes internados no Hospital das Clínicas/UFGM com o objetivo de: a) determinar os índices de colonização dos referidos catéteres; b) correlacionar os resultados obtidos com os achados de hemocultura e c) estudar o padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos dos microrganismos isolados.

Material e Métodos

Foram estudados 76 catéteres venosos retirados de 76 pacientes adultos ou crianças internados no Hospital das Clínicas/UFGM, no período de julho de 1982 a julho de 1983. Os catéteres eram retirados de maneira asséptica quando havia suspeita de complicação ou quando não eram mais necessários. Um fragmento do catéter, em torno de 3cm, era colocado em frasco estéril e enviado, imediatamente, ao laboratório.

Cultura semi-quantitativa - Os fragmentos de catéter eram depositados em placas contendo ágar sangue (BHI ágar com 7% de sangue de carneiro) e com o auxílio de uma alça de platina eram "rolados" na superfície do ágar por, no mínimo, 5 vezes em diferentes direções. A seguir as placas eram incubadas a 37°C em atmosfera de CO₂ obtida com o método da vela. Após 24 horas as placas eram examinadas, o crescimento quantificado e as colônias identificadas, adotando-se procedimentos padronizados (6). Se não havia crescimento com 24 horas, o material era reincubado por período igual, quando então era descartado se negativo.

Hemocultura - Foram colhidas uma a duas amostras de sangue para cultura, de 26 pacientes entre os 76 estudados, pois havia suspeita clínica de septicemia e/ou infecção local. As veno-punções foram feitas em sítios distintos daquele no qual o catéter estava inserido, aspirando-se 10ml de sangue que eram inoculados em frascos Hemocult com 90ml de tripticase soja caldo, SPS e CO₂. Os frascos eram incubados a 37°C, realizando-se repiques em ágar sangue (BHI agar + 7% de sangue de carneiro) após 24 horas, 5 dias e 21 dias ou quando o meio de cultura apresentava características sugestivas de crescimento. Após 21 dias as hemoculturas negativas eram descartadas. A identificação dos microrganismos isolados foi feita, adotando-se metodologia padronizada (6).

Antibiograma - Foi determinada a suscetibilidade, das amostras isoladas de catéteres colonizados, aos antimicrobianos comumente empregados, utilizando-se discos BBL de Amicacina, Ampicilina, Cefalosporina de 1ª geração (Cefalotina), Cefalosporina de 2ª geração (Cefoxitina), Cloranfenicol, Eritromicina, Gentamicina, Lincomicina, Oxacilina, Penicilina G, Sulfametoazol+Trimetoprim e Tetraciclina para microrganismos gram positivos e Amicacina, Ampicilina, Cefalosporina de 1ª geração (Cefalotina), Cefalosporina de 2ª geração (Cefoxitina), Cloranfenicol, Gentamicina, Sulfametoazol+Trimetoprim e Tetraciclina para bastonetes gram negativos. Foram também empregados discos de Carbenicilina para *Pseudomonas aeruginosa*. O método adotado foi o da difusão em ágar (1). O controle foi feito utilizando-se cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Bactrol Disks Set B-Difco), preparados de acordo com as recomendações do fabricante.

Resultados

A cultura foi positiva em 36 dentre os 76 catéteres endovenosos estudados (47,36%). Em 26 deles, o crescimento de microrganismos foi superior a 15 colônias

por placa (34,21%). A relação dos microrganismos isolados encontra-se na Tabela 1. Microrganismos da família Enterobacteriaceae foram os que predominaram no grupo de catéteres com crescimento igual ou superior a 15 colônias por placa, tendo sido a *Klebsiella pneumoniae* o mais frequente (23,33%). No grupo de catéteres com crescimento entre 1 e 14 por placa o microrganismo mais frequentemente isolado foi o *Staphylococcus epidermidis* (50,00%). Nesses casos o crescimento foi uma a duas colônias por placa.

As culturas do sangue periférico de 26 pacientes foram positivas em 7. Em três delas isolou-se *Enterobacter agglomerans*, em duas *Klebsiella pneumoniae*, em uma *Staphylococcus aureus*, e na outra *Candida albicans*. A cultura do catéter de 6 destes pacientes mostrou o mesmo microrganismo isolado na hemocultura correspondente, e um crescimento superior a 15 colônias por placa. As bactérias isoladas nas hemoculturas e catéteres apresentaram idêntico padrão de suscetibilidade aos antimicrobianos testados. Em um paciente do qual isolou-se *Enterobacter agglomerans* do sangue, a cultura do catéter mostrou-se negativa. Nenhum catéter com crescimento de 1 a 14 colônias por placa estava associado com bactériemia. Um estudo comparativo entre os resultados das hemoculturas e das culturas de catéteres acha-se registrado na Tabela 2. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com catéter colonizado e o grupo de pacientes com cultura de catéter negativa com relação à hemocultura positiva ($\chi^2 = 10,9$, $P < 0,001$).

Em relação aos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Quanto aos bastonetes gram negativos foi observado um pequeno número de amostras sensível à Ampicilina, às Cefalosporinas de 1ª geração, à Sulfaletoxazol+Trimetoprim, às Tetraciclínas e ao Cloranfenicol. Entretanto, foi grande o número de amostras sensíveis à Amicacina e a Cefalosporinas de 2ª geração. Dez entre os 23 bastonetes gram negativos isolados só foram sensíveis a estes dois antimicrobianos. Idêntico padrão de resistência foi observado em diversas amostras de bastonetes gram negativos isoladas, no mesmo período, de diferentes espécimes e pacientes, no Setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas/UFMG (dados não publicados). Por outro lado, a maioria das amostras de cocos gram positivos apresentou sensibilidade às Cefalosporinas de 1ª e 2ª gerações e à Amicacina. Todos os cocos gram positivos foram resistentes à Penicilina e à Ampicilina. Foi elevado o número de amostras com resistência a 6 ou mais antibacterianos (73,8% dos bastonetes gram negativos e 60% dos cocos gram positivos).

Tabela 1 - Microrganismos isolados em culturas semi-quantitativas de 36 catéteres endovenosos.

Símbolos: Foram isolados 2 diferentes microrganismos em 4 catéteres do grupo ≥ 15 colônias por placa.

Microrganismo	1 a 14 colônias		≥ 15 colônias	
	Nº	%	Nº	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	7	23,33
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5	50,00	2	6,66
<i>Enterobacter agglomerans</i>	-	-	4	13,33
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	4	13,33
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	10,00	3	10,00
<i>Escherichia coli</i>	-	-	3	10,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	10,00	2	6,66
<i>Candida albicans</i>	-	-	2	6,66
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>				
var. <i>anitratus</i>	-	-	1	3,33
<i>Alcaligenes faecalis</i>	-	-	1	3,33
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	1	3,33
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	10,00	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	10,00	-	-
<i>Aerococco</i>	1	10,00	-	-
Total	10	100,00	30	100,00

Tabela 2 - Comparação entre os resultados de hemocultura e cultura semi-quantitativa de cateter endovenoso em 26 pacientes.

Símbolos: $\chi^2 = 10,9$ ($P < 0,01$).

Hemocultura	Cultura de cateter endovenoso					
	Negativa		1 a 14 colônias		≥ 15 colônias	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Negativa	9	90,0	5	100,0	5	45,5
Positiva	1	10,0	-	-	6	54,5
Total	10	100,0	5	100,0	11	100,0

Em relação ao Tabela 2. Foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com catéter colonizado e o grupo de pacientes com cultura de catéter negativa com relação à hemocultura positiva ($\chi^2 = 10,9$, $P < 0,001$).

Em relação aos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Quanto aos bastonetes gram negativos foi observado um pequeno número de amostras sensível à Ampicilina, às Cefalosporinas de 1ª geração, à Sulfaletoxazol+Trimetoprim, às Tetraciclínas e ao Cloranfenicol. Entretanto, foi grande o número de amostras sensíveis à Amicacina e a Cefalosporinas de 2ª geração. Dez entre os 23 bastonetes gram negativos isolados só foram sensíveis a estes dois antimicrobianos. Idêntico padrão de resistência foi observado em diversas amostras de bastonetes gram negativos isoladas, no mesmo período, de diferentes espécimes e pacientes, no Setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas/UFMG (dados não publicados). Por outro lado, a maioria das amostras de cocos gram positivos apresentou sensibilidade às Cefalosporinas de 1ª e 2ª gerações e à Amicacina. Todos os cocos gram positivos foram resistentes à Penicilina e à Ampicilina. Foi elevado o número de amostras com resistência a 6 ou mais antibacterianos (73,8% dos bastonetes gram negativos e 60% dos cocos gram positivos).

Discussão

O grande problema no diagnóstico de infecções relacionadas ao uso de catéteres endovenosos reside na dificuldade de distinguir infecção de contaminação. Esta diferenciação é particularmente difícil quando se cultivam catéteres usando o método não quantitativo. Maki & Col. (8), empregando um método semi-quantitativo, demonstraram ser possível diferenciar catéteres contaminados de catéteres colonizados. Estes últimos estão intimamente relacionados à infecção. Neste trabalho foi bastante elevada a taxa de colonização dos catéteres estudados (34,2%), especialmente quando comparada com taxas obtidas por Maki & Col. (8) (10,0%), por Cooper & Hopkins (2) (12,4%) e Fisher (5) (6,7%). Moyer & Col. (11), entretanto, relatam resultados que se aproximam mais aos deste estudo (27,7%).

A maioria dos microrganismos que colonizam os catéteres, de acordo com numerosas observações clínicas e microbiológicas, é originária da própria pele do paciente ou das mãos dos profissionais que manipulam estes doentes (7). Moyer & Col. (11), em seus estudos, relatam o encontro de *Staphylococcus epidermidis* em catéteres colonizados, em 71,4%. Este mesmo microrganismo foi o mais comum agente isolado por Maki & Col. (8) e por Cooper & Hopkins (2) (49,2%). De acordo com os estudos dos autores acima citados, os microrganismos mais frequentemente associados com as infecções decorrentes do uso de catéteres endovenosos foram originários da pele do paciente (infecção endógena). Neste estudo, entretanto, foi elevada a incidência de bastonetes gram negativos, especialmente, enterobactérias (63,3%) e o *Staphylococcus epidermidis* só foi isolado de catéteres não colonizados (crescimento inferior a 15 colônias por placa). Por outro lado, microrganismos do grupo das enterobactérias foram isolados em pequena percentagem por Moyer & Col. (11) (10,7%) Maki & Col. (8) (40%) e Cooper & Hopkins (2) (17,1%). Dentre os bastonetes gram negativos, sabe-se que *Enterobacter agglomerans*, *Serratia sp* e *Pseudomonas aeruginosa* não fazem parte, habitualmente, da flora normal da pele (3). Este grupo de bactérias apresenta uma especial habilidade de sobreviver e até mesmo multiplicar em nebulizadores, umidificadores, líquidos de infusão e em soluções antissépticas (3, 9), podendo ser responsáveis por verdadeiras epidemias de infecção hospitalar (9, 12). Outras enterobactérias como a *Klebsiella* também têm sido associadas a surtos de infecções hospitalares (10). Neste estudo, os microrganismos envolvidos nas complicações das cateterizações endovenosas foram, não da flora normal dos pacientes, mas de origem hospitalar (infecção exógena) mesmo que provenientes da flora transitória da pele (flora adquirida no hospital).

A associação entre bacteremia e catéteres colonizados ocorreu em 6 dos 11

Tabela 3 - Suscetibilidade a agentes antibacterianos, de 23 amostras de bastonetes gram negativos e de 5 amostras de cocos gram positivos isoladas de catéteres endovenosos colonizados (≥ 15 colônias por placa).

Símbolos: A Carbenicilina foi utilizada no teste de susceptibilidade apenas para as 2 amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, que se mostraram sensíveis ao antimicrobiano.

Antibacterianos	Bastonetes gram negativos		Cocos gram positivos	
	Nº	%	Nº	%
Amicacina	16	69,6	4	80,0
Ampicilina	1	4,3	0	0,0
Cefalosporinas (1ª geração)	1	4,3	4	80,0
Cefalosporinas (2ª geração)	14	60,7	5	100,0
Cloranfénicol	4	17,4	2	40,0
Gentamicina	9	39,1	3	60,0
Sulfametoazol + trimetoprim	2	8,7	1	20,0
Tetraciclinas	2	8,7	2	40,0
Eritromicina	-	-	3	60,0
Lincomicina	-	-	3	60,0
Oxacilina	-	-	2	40,0
Penicilina	-	-	0	0,0

Tabela 4 - Padrões de resistência a antibacterianos apresentados por microrganismos isolados de catéteres endovenosos colonizados (15 \geq colônias por placa).

Padrões de Resistência	Bastonetes gram negativos		Cocos gram positivos	
	Nº	%	Nº	%
I 6 a 8 antibacterianos	17	73,9	3	60,0
II 4 a 5 antibacterianos	4	17,4	1	20,0
III 2 a 3 antibacterianos	2	8,7	1	20,0
Total	23	100,0	5	100,0

acima citados, os microrganismos mais frequentemente associados com as infecções decorrentes do uso de catéteres endovenosos foram originários da pele do paciente (infecção endógena). Neste estudo, entretanto, foi elevada a incidência de enterobactérias (63,3%) e o *Staphylococcus epidermidis* só foi isolado de catéteres não colonizados (crescimento inferior a 15 colônias por placa). Por outro lado, microrganismos do grupo das enterobactérias foram isolados em pequena percentagem por Moyer & Col. (11) (10,7%) Maki & Col. (8) (40%) e Cooper & Hopkins (2) (17,1%). Dentre os bastonetes gram negativos, sabe-se que *Enterobacter agglomerans*, *Serratia sp* e *Pseudomonas aeruginosa* não fazem parte, habitualmente, da flora normal da pele (3). Este grupo de bactérias apresenta uma especial habilidade de sobreviver e até mesmo multiplicar em nebulizadores, umidificadores, líquidos de infusão e em soluções antissépticas (3, 9), podendo ser responsáveis por verdadeiras epidemias de infecção hospitalar (9, 12). Outras enterobactérias como a *Klebsiella* também têm sido associadas a surtos de infecções hospitalares (10). Neste estudo, os microrganismos envolvidos nas complicações das cateterizações endovenosas foram, não da flora normal dos pacientes, mas de origem hospitalar (infecção exógena) mesmo que provenientes da flora transitória da pele (flora adquirida no hospital).

pacientes (54,5%) nos quais a hemocultura foi realizada e em nenhum paciente cuja cultura do catéter resultou em crescimento de 1 a 14 colônias por placa. Por outro lado, no grupo de pacientes com cultura de catéter negativa ocorreu bacteremia em apenas um caso, provavelmente secundária à infecção urinária diagnosticada, 3 dias antes da cultura do catéter, através de urocultura positiva para *Enterobacter agglomerans*. Neste estudo, os microrganismos associados à bacteremia foram os mesmos relatados por Maki & Col. (8) (*Candida* sp, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella/Enterobacter*). De acordo com estes autores tais microrganismos, por serem mais invasores, tendem à disseminação. Não foi possível determinar, com segurança, se os catéteres associados à bacteremia foram colonizados primariamente ou secundariamente, porque não foram realizadas culturas de espécimes de outros sítios. Do ponto de vista prático, entretanto, esta diferenciação não é tão necessária porque o catéter colonizado pode não apenas iniciar uma bacteremia como também perpetuá-la, sendo recomendável em qualquer dos casos a sua retirada (8).

Deve ser salientado que as amostras de bastonetes gram negativos isoladas neste estudo mostraram-se resistentes à maioria dos antimicrobianos testados sendo que várias delas exibiram um padrão de resistência semelhante (resistência a todas as drogas exceto à Cefoxitina e/ou Amicacina). Este mesmo padrão de resistência foi observado em outras amostras de bastonetes gram negativos isolados no Laboratório durante a época em que este estudo foi realizado. Este comportamento frente aos antimicrobianos (multi-resistência) é observado em bactérias "hospitalares" e, amostras com esta "marca genética" predominavam no Hospital das Clínicas, no período.

Com relação aos cocos, o número de amostras foi pequeno e entre as 5 isoladas, todas mostraram-se resistentes à Penicilina e à Ampicilina e sensíveis à Cefoxitina.

A alta incidência de bactérias sensíveis à Cefoxitina ocorreu talvez devido ao fato de que este antibacteriano estava sendo lançado no comércio naquela ocasião, e não havia exercido ainda pressão seletiva, com consequente seleção de amostras resistentes.

Finalizando, este trabalho demonstra a importância de se fazer, rotineiramente, cultura semi-quantitativa de catéteres endovenosos, pois este método, além de simples fornece informações mais precisas para o diagnóstico tanto de infecção local quanto de septicemia relacionada à cateterização.

Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Oto Guimarães Mourão por ter possibilitado a realização de parte deste trabalho no setor de Bacteriologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas/UFGM.

Referências Bibliográficas

- 1.Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
- 2.Cooper, G.L. & Hopkins, C.C. - Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by direct gram staining of catheter segments. *N. Engl. J. Med.*, 312:1142-1147, 1985.
- 3.Eickhoff, T.C. - Nosocomial infections. In: Hoeprich, P.D., ed. - *Infectious diseases: a modern treatise of infectious processes*. Philadelphia, Harper & Row, sect. 1, chap. 3, p.38-44, 1983.
- 4.Faintuch, J.; Faintuch, J.J.; Machado, M.C.C. & Raia, A.A. - Complicações técnicas e infecciosas do cateter venoso central na alimentação parenteral de pacientes cirúrgicos. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. São Paulo*, 36:109-113, 1981.
- 5.Fischer, P.P. - Bacteriologia de pontas de catéteres intravenosos. Belo Horizonte, Instituto de Ciências Biológicas/UFGM, 1986. (Tese de Mestrado).

6. MacFaddin, J.F. - Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Panamericana, 1980.
7. Maki, D.G. - Nosocomial bacteremia: an epidemiologic overview. Am. J. Med., 70:719-732, 1981.
8. Maki, D.G.; Weise, C.E. & Sarafin, H.W. - A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infections. N. Engl. J. Med., 296:1305-1309, 1977.
9. Malizia, W.F.; Gangarosa, E.J. & Goley, A.F. - Benzalkonium chloride as a source of infection. N. Engl. J. Med. 263:800-802, 1960.
10. Morse, L.J.; Williams, H.L.; Grenn, F.P. - Septicemia due to *Klebsiella pneumoniae* originating from a hand-cream dispenser. N. Engl. J. Med. 277:472-473, 1967.
11. Moyer, M.A.; Edwards, L.D. & Farley, L. - Comparative culture methods on 101 intravenous catheters. Arch. Intern. Med., 143:66-69, 1983.
12. Plotkin, S.A. & Austrian, R. - Bacteremia caused by *Pseudomonas* sp following the use of materials stored in solutions of a cationic surface-active agent. Am. J. Med. Sci., 235:621-627, 1958.

CIRCULAÇÃO DE ENTEROBACTÉRIAS PATOGÊNICAS EM MENORES INSTITUCIONALIZADOS: III - ESTUDO SOROLÓGICO

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

Recebido para publicação em 16/10/87

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

Resumo

Os níveis séricos de anticorpos somáticos, a enteropatogênicos bacterianos, foram determinados em 103 crianças diarréicas institucionalizadas e em 52 adultos contactantes. *Escherichia coli* enteropatogênica e *Shigella* induziram reatividade significativamente diferente de *Salmonella* e *Escherichia coli* enterotóxica. De acordo com o título adotado, as faixas de 1:40, 1:80, e 1:160, para os dois primeiros agentes, 20 a 70% dos indivíduos foram sensibilizados e 6 a 56% perderam a positividade, enquanto para *Escherichia coli* enterotóxica e *Salmonella* a reatividade foi de cerca de 2 a 43% e as perdas de 30 a 100%.

Summary

Circulation flow of enteropathogenic bacteria in institutional children. III - Serologic study

The level of somatic antibodies against enteropathogenic bacteria was demonstrated in 103 institutionalized children and 52 adults staff contacts in the city of Rio de Janeiro, Brazil. *Shigella* and enteropathogenic *Escherichia coli* showed higher antibodies prevalence than enterotoxic *Escherichia coli* and *Salmonella*. According to the titer adopted as reatogenic 1:40, 1:80 and 1:160, 20 to 70% of subjects showed reactivity for both enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* and 6 to 56% have lost antibodies. The reactivity for enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Salmonella* were found in 2 to 43% of subjects and 30 to 100% lost antibodies.

Introdução

O diagnóstico laboratorial das enteroinfecções bacterianas concentra-se basicamente, no isolamento e caracterização do agente etiológico. A metodologia disponível, a coprocultura, nem sempre elucida a causalidade da infecção. As limitações pertinentes decorrem, parcialmente, da eliminação irregular das enterobactérias patogênicas cujas concentrações inferiores às da flora normal, podem ainda sofrer reduções maiores com o emprego de meios seletivos-indicadores. A aplicação da hemaglutinação passiva (HP) tem sido enfatizada como uma técnica complementar e auxiliar aos coprocultivos (6, 12, 13), oferecendo subsídios à vigilância epidemiológica sobre as flutuações da incidência e colonização de enteropatogênicos em determinados ecossistemas (2, 10, 11).

O presente trabalho teve por objetivo identificar e caracterizar as respostas sorológicas, homólogas e heterólogas, para *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterotóxica (ETEC) em um sistema fechado, estabelecendo, paralelamente, critérios de positividade para interpretação destas reações.

Material e Métodos

Amostragem - Constituída por 155 soros humanos pareados oriundos de 103 crianças diarréicas de 0 - 5 anos de idade, internos em um Centro de Triagem (CRT-II) para menores abandonados, da cidade do Rio de Janeiro e 52 funcionários adultos contactantes. A 1ª colheita sérica foi efetuada num período máximo de duas semanas, pós episódio entérico, enquanto a segunda amostra foi obtida em períodos variáveis de 1 a 4 meses subsequentes.

Teste sorológico - A pesquisa de anticorpos somáticos aos agentes bacterianos EPEC, ETEC, *Shigella* e *Salmonella* foi realizada pela micro-hemaglutinação passiva (MHP) preconizada por Neter & Col., 1955 (12) com algumas modificações introduzidas por Cáceres & Mata, em 1970 (1).

Preparo de抗ígenos - As amostras padrão utilizadas no preparo de抗ígenos correspondiam aos sorogrupo/sorotipos relacionados na Tabela 1. Os抗ígenos monoespecíficos, polissacárides parcialmente purificados, foram obtidos a partir do crescimento bacteriano de 24 horas a 37°C em Brain Heart Infusion Agar (Difco) suspenso em salina fosfatada (PBS pH 7,2) com densidade equivalente ao 2º tubo da escala de Mc Farland. Em sequência, submetia-se a suspensão ao tratamento físico-químico pela adição de NaOH 0,1 N e aquecimento a 100°C por 1 hora, sendo o extrato dializado a frio, centrifugado e filtrado o sobrenadante (1, 12). Os抗ígenos monoespecíficos, após titulação, eram misturados passando a constituir o polivalente correspondente.

Tabela 1 - Sorogrupo de enterobactérias utilizados no teste de microhemaglutinação.

GENÉROS/ESPÉCIES (AMOSTRA)	SOROGROUPOS/SOROTIPOS	ANTÍGENO POLIVALENTE
<i>Escherichia coli</i> (EPEC)	055: K59 0111: K58 026: K60 0127: K63 086: K61 0124: K72 0125: K70 0126: K71 0128: K67 0119: K69	A
<i>Escherichia coli</i> (ETEC)	06: K15 08: K40 020: H 025: K7 078: H11	EPEC
<i>Shigella dysenteriae</i>	1 e 2	
<i>Shigella flexneri</i>	1 e 2	
<i>Shigella boydii</i>	1, 3 e 5	<i>Shigella</i>
<i>Shigella sonnei</i>	Fase I	
<i>Salmonella</i>	<i>S. paratyphi</i> B (imóvel) e <i>S. javi</i> (B) <i>S. thompson</i> e <i>S. newport</i> (C1 e C2) <i>S. dublin</i> (D1) <i>S. london</i> (E1)	<i>Salmonella</i>

Reação de micro-hemaglutinação - O teste foi executado em micro-placas com orifícios de fundo côncavo, nos quais se fez diluições de 1:20 até 1:2560, dos soros pareados, acrescidos de hemácias de carneiro formolizadas e sensibilizadas pelos diferentes抗ígenos polivalentes (EPEC, ETEC, *Shigella* e *Salmonella*). Após incubação por 45 minutos a 37°C procedia-se as leituras das reações, mantendo-se o sistema em geladeira por uma noite, para uma leitura posterior.

Leritura das reações - Considerou-se como reação positiva a formação de um tapete irregular cobrindo o fundo do orifício, enquanto a formação de um botão regular de hemácias, caracterizou a negatividade da reação.

Testes bacteriológicos - Consistiram de coprocultura e ensaios de toxicogenicidade, descritos no Trabalho II (submetido a publicação).

Análise estatística - Foram utilizados testes Q de Cochran e Mc Nemar.

Tabela 2 - Reatividade de 155 soros pareados oriundos do CRT-II para diferentes enterobactérias patogênicas.

Soros analisados			
Títulos	Não reagentes	Reagentes específicos compartilhados	
1/40	7	45	103
1/80	31	71	53
1/160	78	70	7

Tabela 3 - Freqüência numérica e percentual de soros reagentes para prováveis enterobactérias infectantes.

Símbolos: () = Percentagem.
Teste de Cochran

Títulos	EPEC	ETEC	Shigella	Salmonella	Q	P
1/40	120 (77,4)	66 (42,5)	99 (63,9)	44 (28,4)	97,38	< 0,001
1/80	72 (46,5)	26 (16,8)	79 (51,0)	18 (11,6)	17,69	< 0,001
1/160	31 (20,0)	4 (2,6)	45 (29,0)	4 (2,6)	63,23	< 0,001

Tabela 4 - Frequência de mudanças de títulos (Conversão e Perda) segundo a enterobactéria no CRT-II.

Antígenos	Títulos			1:80			1:160		
	1:40	1:80	1:160	1:40	1:80	1:160	1:40	1:80	1:160
EPEC	92	44,4	6,5	48	22,4	29,2	16	10,8	56,3
ETEC	40	22,6	32,5	11	10,4	36,4	4	0	75,0
Salmonella	28	12,6	53,6	11	4,9	63,6	1	1,9	100,0
Shigella	73	31,7	17,8	50	27,6	24,0	22	17,3	18,2

Resultados

A reatividade dos 155 soros examinados frente a um dos quatro抗ígenos utilizados, segundo o critério adotado como positivo, encontra-se discriminado na Tabela 2. Evidencia-se que quando o título 1:40 foi considerado como expressão de positividade, apenas 7 soros não reagiram, correspondendo a 5% dos casos. Em contraposição, no título 1:160, a metade da amostragem (78) apresentou-se negativa ou destituída de atividade hemaglutinante. No que se refere à distribuição de anticorpos segundo os prováveis agentes etiológicos infectantes (Tabela 3) chama a atenção o predomínio de EPEC no nível 1:40, invertendo-se, no entanto, a favor de Shigella, à medida que títulos mais altos, 1:80 e 1:160 são considerados.

A Tabela 4 expressa a reatividade dos soros em termos de ganho ou perda desta capacidade de acordo com os três títulos considerados e os抗ígenos de referência. Designou-se por conversão a freqüência (percentual) com que um soro negativo tornou-se positivo ou aumentou de título no período mediado entre as duas colheitas. Assim, calculou-se, dividindo-se o número de soros negativos da 1ª amostra que se tornaram positivos na 2ª, pelo total de negativos da 1ª amostra. A freqüência da perda de positividade entre as duas tomadas séricas foi calculada dividindo-se o número de soros positivos da 1ª coleta que se tornaram negativos na 2ª, pelo total de positivos oriundos da 1ª amostra.

Considerando a disponibilidade das análises bacteriológicas destes indivíduos, estabeleceu-se também as comparações entre as duas metodologias, coprocultura e sorologia no diagnóstico de infecções entéricas. Tais resultados figuram na Tabela

Tabela 5 - Relação entre positividade de coprocultura e de sorologia em indivíduos presumivelmente infectados do CRT-II
Símbolos: p1 = Coprocultura positiva; p2 = Sorologia positiva e n = Presumivelmente infectados.

Agentes	Títulos					
	1:40 n=122		1:80 n=77		1:160 n=42	
	p1	p2	p1	p2	p1	p2
EPEC	17,2	98,4	27,3	93,5	50,0	69,0
ETEC	20,0	93,0	39,0	69,4	93,0	20,0
Salmonella	13,0	95,7	28,6	85,7	85,7	57,1
Shigella	9,1	100,0	11,3	99,0	19,0	94,0

5, particularizando-se por presumivelmente infectados o conjunto de indivíduos identificados através dos dois métodos, sendo o p1 o percentual com coproculturas positivas e por p2 o percentual com reações sorológicas positivas.

Discussão

Os resultados obtidos demonstraram inicialmente uma intensa e compartilhada circulação de enteropatógenos induzindo resposta sorológica detectável nos três níveis adotados: 1:40, 1:80 e 1:160 (Tabela 2).

A prevalência de EPEC e *Shigella* é evidente, mostrando reatividade significativamente diferente de *Salmonella* e ETEC, qualquer que seja o título considerado (Tabela 3). O fenômeno é tão atuante que mesmo eliminando os casos em que houve resposta para mais de uma bactéria, os percentuais de positividade oscilaram entre 20 a 49% para EPEC e 16 a 57% para *Shigella* (9). Confirma-se assim, a maior sensibilização antigenica provocada por esses agentes, contudo, não se pode afirmar se tais resultados expressam a freqüência com que foram colonizados ou uma maior capacidade imunogênica. Também não se pode excluir a hipótese da variabilidade da duração da resposta humoral detectada pela hemaglutinação passiva. Para EPEC, *Salmonella* e *Shigella*, os períodos relatados na literatura variaram entre 4 meses a 2 anos (2, 10, 12), enquanto para ETEC, o registro tem sido mais efêmero, em torno de 3 meses (3, 17).

Ainda no que se refere às reações cruzadas ou inespecíficas, assinala-se que dos 155 soros analisados, em 46 (30%) foi impossível determinar o mais provável patógeno infectante, uma vez que responderam com o mesmo título para mais de duas entidades. Este evento era previsível não só devido às reações cruzadas decorrentes da estreita antigenicidade existente entre os membros da família Enterobacteriaceae (7, 8, 14) mas, principalmente em função das características da amostragem: um grupo populacional exposto à multiplicidade de estímulos imunogênicos, onde as possibilidades de flutuação e associação de bactérias tornam-se ampliadas (4, 9, 15, 16), aumentando, consequentemente, a reatividade sorológica.

As análises de mudanças de títulos (Tabela 4) referentes a ganho ou aumento de sensibilização (conversão) demonstraram que EPEC e *Shigella* exibiram títulos superiores a ETEC e *Salmonella*, identificando-se ainda com o maior critério (1:160) na 2ª amostra, 10 a 17% dos infectados. A situação se inverte no tocante à perda de positividade para ETEC e *Salmonella*, respectivamente 32 e 53% dos indivíduos registraram perda no menor título e no maior, praticamente todos. Mais uma vez confirma-se o caráter prevalente de EPEC e *Shigella*.

A avaliação dos dois métodos laboratoriais põe em destaque a maior sensibilidade da análise sorológica (p2) em comparação com a coprocultura (p1) na identificação de indivíduos presumivelmente infectados, quando títulos 1:40 e 1:80 foram considerados.

Entretanto, quando o título 1:160 foi adotado, a diferença persistiu para *Shigella* e EPEC, mostrando-se inadequado para ETEC e *Salmonella*. Particularizando-se a análise, observa-se que com o critério 1:40 a quase totalidade dos indivíduos presumivelmente infectados foi detectada, enquanto a coprocultura contribuiu modestamente, alcançando o máximo de 9,1% para *Shigella*. Com o título 1:80, reduziu-se o total de presumivelmente infectados, resultando num aumento de identificação pela coprocultura, acentuadamente para ETEC e *Salmonella*. E finalmente com o título 1:160, apenas *Shigella* conserva alta percentagem de identificação pela sorologia com modesta contribuição da coprocultura. Expressa-se assim, a especificidade da hemaglutinação para *Shigella* (1, 2, 11).

Por outro lado, assinala-se que sempre ocorreram resultados sorológicos negativos em pacientes com exames bacteriológicos positivos, excetuando-se no caso das shigelas.

Admite-se que esta situação seja característica de pessoas na fase inicial da doença que ainda não desenvolveram o título definido como positivo.

As altas percentagens de reagentes concentrados no nível 1:40, exigem uma interpretação cautelosa, dada a notável ocorrência de reações cruzadas (6, 9, 15). Todavia o confronto desses dados com os referentes ao título 1:80 fornecerá,

inegavelmente, uma avaliação mais segura. Por fim, infere-se, com base nos resultados obtidos que a adoção de títulos 1:160 pouco acrescentará à qualidade dessa análise, com exclusão de *Shigella*.

Ainda que vários critérios tenham sido sugerido para interpretação de resultados sorológicos visando o diagnóstico (1, 6, 12, 13), a proposição acima refere-se a estudos epidemiológicos para populações com características e condições de vida semelhantes às apresentadas por este estudo.

No confronto dos dois métodos, é incontestável que a sorologia oferece possibilidades maiores e mais imediatas para uma análise sobre a circulação da maioria das enterobactérias patogênicas em populações expostas ao risco continuado de infecção; entretanto, a utilização dos dois métodos, permitirá aproveitamento de informações que só a articulação das duas metodologias propiciará e representará consequentemente a melhor forma de estudo das situações em causa.

Agradecimentos

Aos Drs. Eunice Tupinambá, Kátia de Andrade Zukerman, Guilherme Buchman, Margarida Neves Abrantes e às Senhoras Lindalva Braga e Zelia Maria do Nascimento do Centro de Recepção e Triagem II, pelas facilidades propiciadas na colheita de material. Ao Professor Walter Leser, pelas sugestões e análise estatística efetuada.

Referências Bibliográficas

1. Caceres, A. & Mata, L.J. - Hemaglutinación indirecta para la investigación de anticuerpos a enterobacteriáceas. Rev. Lat. Amer. Microbiol., 12:137-144, 1970.
2. Caceres, A. & Mata, L.J. - Serologic response of patients with *Shiga dysentery*. J. Infect. Dis., 129:439-443, 1974.
3. Cushing, A.H. & Smart, J. - Gastrointestinal carriage of toxigenic bacteria: relation to diarrhea and to serum immune response. J. Infect. Dis., 151:114-123, 1985.
4. Ekanem, E.E.; Du Pont, H.L.; Pickering, L.K.; Selwin, B.J. & Hawkins, C.M. - Transmission dynamics of enteric bacteria in day care centers. Am. J. Epidemiol., 118:562-572, 1983.
5. Gross, R.J.; Scotland, S.M. & Rowe, B. - Enterotoxin testing *Escherichia coli* causing epidemic infantil enteritis in the United Kingdom. Lancet, 1:629-631, 1976.
6. Haltalin, K.; Matteck, M.B. & Nelson, J.D. - Microdetermination of *Shigella* hemagglutinins in human and rabbit sera with monovalent and polyvalent antigens. J. Immunol., 97:517-519, 1966.
7. Kauffmann, F. - The serology of the coli group. J. Immunol., 57:71-100, 1947.
8. Kauffmann, F. - The bacteriology of Enterobacteriaceae Munksgaard, Copenhagen, 1966.
9. Lacerda, M.D. - Estudo soro-epidemiológico de infecções entéricas. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. Tese de Doutorado, 1986.
10. Mata, L.J.; Caceres, A.; Fernandez, R.T.; Cordon, M.F. & Rosales, M. - Avances sobre el conocimiento de la disenteria en Guatemala. Rev. Lat. Am. Microbiol., 14:1-10, 1972.
11. Mata, L.J.; Gangarosa, E.J.; Caceres, A.; Pereira, D.R. & Mejicanos, M.L. - Epidemic *Shiga Bacillus dysentery* in Central America. I - Etiologic investigations in Guatemala, 1969. J. Infect. Dis., 122:170-180, 1970.
12. Neter, E.; Westphal, O.; Luderitz, O. & Gorzynski, E.A. - The bacterial hemagglutination test for the demonstration of antibodies to Enterobacteriaceae. Ann. N. Y. Acad. Sci., 66:141-156, 1956.
13. Neter, E. & Dunphy, D. - The duration of the hemagglutination response in the serum of children with shigellosis and salmonellosis. Pediatrics., 20:78-86, 1957.

14. Ørskov, I.; Ørskov, F. & Jann, K. - Serology, chemistry and genetics of "O" and "K" antigens of *Escherichia coli*. *Bact. Rev.* 41:667-710, 1977.
15. Pickering, L.K.; Evans, D. & DuPont, H.L. - Diarrhea caused by *Shigella*, Rotavirus and giardia in day care centers: prospective study. *J. Pediat.*, 99:51-56, 1981.
16. Sattar, S.A.; Evans, N.L. & Springthorpe, S.V. - Institutional outbreaks of rotavirus diarrhea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *J. Hyg.*, 96:277-289, 1986.
17. Stoll, B.J.; Svennerholm, A.M.; Gothe fors, L.; Barua, D.; Huda, S. & Holmgren, J. - Local and systemic antibody responses to naturally acquired enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in an endemic area. *J. Infect. Dis.*, 153:527-534, 1986.

COMPARATIVE FERMENTATION OF GLUCOSE AND SUCROSE BY ZYMOMONAS MOBILIS

Maria da Penha L. Mortatti
 & Yong K. Park

Recebido para publicação em 22/10/87

Universidade Estadual de Campinas
 Faculdade de Engenharia de Alimentos
 13100 Campinas SP, Brasil

Summary

Comparative fermentations of glucose and sucrose was studied by fermentating respective glucose and sucrose concentration 100-200 g/l at 30°C and 35°C by strain of *Zymomonas mobilis* NRRL B-14022. The yields of ethanol from glucose were higher than sucrose fermentation, and the highest ethanol yields of glucose was obtained when concentration of substrate 200g/l was fermented at 30°C. In the case of sucrose fermentation, highest yield was obtained when sucrose concentration 100g/l was fermented at 35°C. Sucrose fermentation by this microorganism, produced levan at 30°C, whereas formation of levan was inhibited at 35°C. Concentration of residual sugars after fermentation of sucrose at 30°C, were higher than when glucose was used. In the case of fermentation of sucrose at 35°C, the concentrations of residual sugars were slightly decreased as compared with 30°C. In fermentation of glucose at 35°C the concentrations of residual sugars were increased markedly in comparison with 30°C.

Resumo

Estudo comparativo da fermentação de glicose e sacarose por *Zymomonas mobilis*

Um estudo comparativo da fermentação de glicose e sacarose pela linhagem de *Zymomonas mobilis* NRRL B-14022 foi realizado empregando-se glicose e sacarose nas respectivas concentrações de 100 a 200g/l e temperaturas de incubação de 30 e 35°C. Verificou-se que essa linhagem fermentou a glicose mais eficientemente à etanol do que quando a sacarose foi empregada. O melhor rendimento de etanol a partir de glicose foi obtido com a concentração inicial do substrato (S_0) de 200 g/l e temperatura de 30°C. Nas fermentações realizadas com sacarose, o melhor rendimento de etanol foi obtido com $S_0 = 100\text{g/l}$ e temperatura de 35°C. Durante a fermentação da sacarose a 30°C por esse microorganismo, observou-se a produção de levano. A formação de levano foi inibida quando a fermentação foi realizada a 35°C. A concentração de açúcares residuais no final das fermentações com sacarose, à temperatura de 30°C, foi mais elevada em comparação com as fermentações de glicose. No caso das fermentações de sacarose a 35°C, a concentração de açúcares residuais foi ligeiramente menor em relação à fermentação a 30°C. E nas fermentações de glicose a 35°C, a concentração de açúcares residuais foi bastante elevada em comparação com a fermentação a 30°C.

Introduction

Considerable significance has been paid recently to *Zymomonas mobilis* since it ferments glucose to ethanol by the Entner-Duodoroff pathway under anaerobic conditions (14). In comparison with the wealth of information available on yeast used in industrial alcohol fermentation, *Zymomonas* sp., is relatively little studied as an ethanol-producing microorganism.

Roger & Col. (12) and Lee & Col. (5), reported that *Z. mobilis* can convert glucose efficiently and rapidly to ethanol with higher specific rates of glucose uptake and ethanol production than industrially useful yeasts. There are a number of publications pertaining to glucose fermentation by *Z. mobilis*, however, sucrose fermentation by this organism are rare.

Dawes and Ribbons (1), has demonstrated levan formation from sucrose when washed cell and cell extract of *Z. mobilis* was mixed with a sucrose solution. De Ley and Swings (2), and Swings and De Ley (15) reported that there was no significant difference between sucrose-fermenting and non-sucrose-fermenting strains of *Zymomonas*. The sucrose fermentation in a *Zymomonas* strain seems to be an inducible property. Sucrose fermentation in batch culture by the organism was carried out by Lee & Col. (6), who found a reduction in ethanol yield due to levan formation and ethanol inhibition of sucrose metabolism. Lyness and Doelle (7) have examined the relationship between sucrose hydrolysis and glucose utilization during sucrose fermentation by the organism and found that ethanol production and fermentation depend on the rate of catabolism of the products of sucrose hydrolysis. Previously, we have found that strains of *Z. mobilis* produce both extra and intracellular sucrose hydrolysing enzymes, and the extracellular enzyme action may resemble that of β -fructofuranosidase (8). Lately, we have also found that levan formation is effected mainly by a *Z. mobilis* cell-bound enzyme, and we have established optimum conditions for formation and inhibition of levan during sucrose fermentation (11).

The objectives of this investigation were to make a comparison between sucrose and glucose fermentations in batch culture under different temperatures and concentrations of sucrose, and to demonstrate the relationship between sucrose hydrolysing and fermentation activity by *Z. mobilis*.

Materials and Methods

Microorganism - The strain of *Z. mobilis* used in this investigation was *Z. mobilis* NRRL B-14022. The microorganism was maintained as a slant culture in nutrient agar containing glucose (2% W/V) (Dawes and Ribbons) (1).

Alcohol fermentation procedure - The procedure of alcohol fermentation was the same as described in previous publications (10, 16). Erlenmeyer flasks 500ml were used with 200ml of the fermentation broth containing 2g of peptone, 2g of yeast extract, and glucose or sucrose (concentrations of 10, 15, 20% respectively, which were sterilized separately). The inoculum of the *Z. mobilis* was grown for 2 days unshaken at 30°C in 250ml Erlenmeyer flasks containing 40ml of the same culture medium. A 5ml portion of the inoculum was added to 500ml Erlenmeyer flasks and the pH of the medium was adjusted to 6.0 with 1N NaOH and protected from the atmosphere by a tube containing concentrated sulfuric acid. All Erlenmeyer flasks were incubated unshake at 30°C and 35°C.

Determination of levan formation - Formation of the levan was determined as described by Hestrin & Col. (4) and Dawes and Ribbons (1). One ml of fermentation broth was added to 3ml ethanol in a centrifuge tube and a drop of 1% CaCl_2 added to the mixture to hasten flocculation of levan. The suspension was centrifuged and the sedimented levan freed from reducing sugar and sucrose residues by twice-repeated solubilization in H_2O over a water bath and precipitation each time with ethanol. The final sediment was taken up in 3.0ml, 0.5% oxalic acid and complete hydrolysis effected by heating in a boiling water-bath for 1 hr. The hydrolysate obtained was neutralized with 2N NaOH, and diluted to a suitable volume

with water. The amounts of fructose in the hydrolysate were estimated by both cysteine-carbazol (3) and Somogyi methods (13).

Other chemical analysis - Reducing sugars were determined by the method of Nelson (9), and sucrose was estimated as hexose equivalent after hydrolysis with 2N HCl in boiling water-bath for 1 hr. The cell mass was determined by measuring the absorbance of the cell suspension at 660nm. The concentration of ethanol was estimated by measuring the absorbance at 340nm after incubation of a mixture of sample and a solution containing NAD and alcohol dehydrogenase for 70 min at 25°C.

Results and Discussion

It is known that almost quantitative fermentation of glucose to ethanol and CO_2 is a distinctive characteristics of the genus *Zymomonas*. In the case of sucrose fermentation by this organism, efficiency of the conversion is reduced due to formation of levan (6). Therefore, we have attempted to compare the pattern of fermentation between sucrose and glucose under various conditions by *Z. mobilis* NRRL B-14022. As we reported previously (8), this strain of *Zymomonas* is able to grow and ferment sucrose rapidly.

Analytical results following fermentation at 30°C for 60 hr of glucose and sucrose (concentrations of 10%, 15% and 20%) are presented in Figure 1 and Table 1. The yield of CO_2 and ethanol from glucose was higher than from sucrose. Yields of ethanol from 10%, 15% and 20% glucose were 93.0%, 94.6% and 94.0% of the theoretical value. This is considered to be efficient conversion of glucose to ethanol without significant difference between the various concentrations of glucose used. On the other hand, yields of ethanol from 10%, 15% and 20% sucrose were 76.7%, 75.6% and 71.4% of the theoretical value. In comparison with glucose fermentation, yields of ethanol from sucrose were considerably lower. The data also reveal that an increase in sucrose resulted in a significant decrease of the yield of ethanol. Furthermore, levan was formed during sucrose fermentation, and the concentration of residual sugars after termination of fermentation were higher than when glucose was used. Both levan and residual sugars were increased with an increase in sucrose concentration. The lower yield of ethanol from sucrose was likely due to formation of levan and non-utilized sugars. The presence of residual sugars in the fermentor means a limitation of the catabolic activity of cells towards sucrose or its hydrolysates under these conditions.

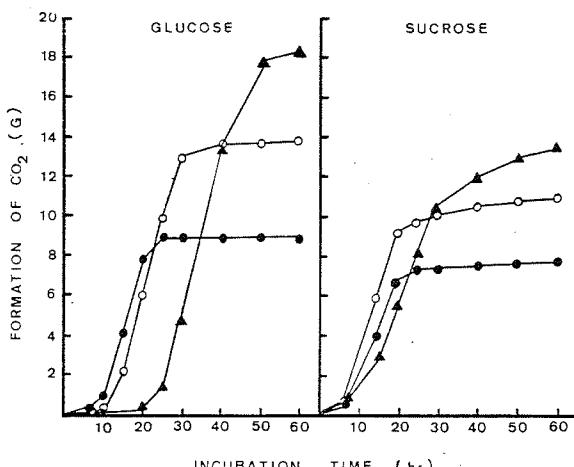
Levan formation during sucrose fermentation by this microorganism,

Table 1 - Analytical results after termination of fermentation of glucose and sucrose by *Z. mobilis* NRRL B-14022 at 30°C.

	Ethanol yield (%)	Total Reducing Sugars (g)	Levan formation (g)
Glucose 10%	93.0	0.16	-
Glucose 15%	94.6	0.32	-
Glucose 20%	94.0	0.96	-
Sucrose 10%	76.7	1.76	0.19
Sucrose 15%	75.6	2.88	0.39
Sucrose 20%	71.4	5.44	0.60

Figure 1 - Time course of fermentation of glucose and sucrose by *Z. mobilis* NRRL B-14022 at 30°C.

Symbols: —●— 10%; —○— 15%; —▲— 20%.



reported previously (11), can be inhibited by adjusting the pH of the medium or using a higher temperature for fermentation (e.g. 35°C). The same systems of fermentation described above were performed at 35°C, and the results are shown in Figure 2 and Table 2. It is apparent that the difference in yields of CO_2 and ethanol from fermentations using glucose and sucrose were smaller at 35°C as compared to the fermentation at 30°C. Yields of ethanol at 35°C from 10%, 15% and 20% glucose were 92.0%, 82.2% and 68.5% of the theoretical value. In comparison yields of ethanol at 30°C from 10% glucose were slightly lower and decreased sharply with increase in glucose concentration to 15% and 20%. Residual sugars were also increased over that of fermentation at 30°C. Yields of ethanol from 10%, 15% and 20% sucrose were 82.2%, 77.6% and 66.0% of the theoretical value. It is interesting to note that yields of ethanol from 10% and 15% were slightly higher than that for sucrose fermentation at 30°C. This is probably due to fact that levan was not formed at 35°C. It was also found that residual sugars were slightly lower than that for fermentation at 30°C. In the case of 20% sucrose, the yield of ethanol was significantly decreased although levan was not formed, as compared to fermentation at 30°C. It is noted that there are higher concentrations of non-utilized residual sugars in comparison with fermentation at 30°C. It can be concluded that higher temperature (35°C) and higher sucrose concentration decrease metabolic activity of microorganism.

As mentioned above, sucrose fermentation leaves more non-utilized residual sugars after termination of fermentation. The residual sugars after termination of fermentation. The residual sugars were determined periodically before and after hydrolysis of sucrose by acid during the course of fermentation and the results are shown in Figure 3, which therefore presents a relationship between sucrose hydrolysis and hydrolysate utilization by the cells. It was found that maximum concentrations of reducing sugars before hydrolysis of the medium occurred around the initiation of the exponential stage of sugar consumption. Furthermore, there is no significant difference in concentrations of nonutilized reducing sugars between before and after hydrolysis of the medium. The major components of the nonutilized sugars were sucrose hydrolysates. From these results, one can deduce that sucrose hydrolysing activity is not the limiting factor for sucrose fermentation by the organism.

Figure 2 - Time course of fermentation of glucose and sucrose by *Z. mobilis* NRRL B-14022 at 35°C.
Symbols: ● 10%; ○ 15%; ▲ 20%.

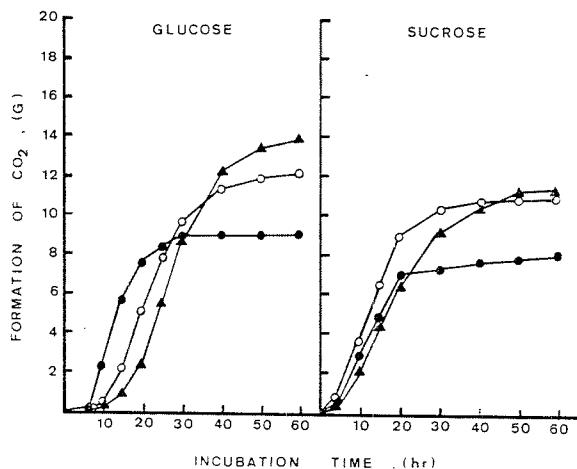
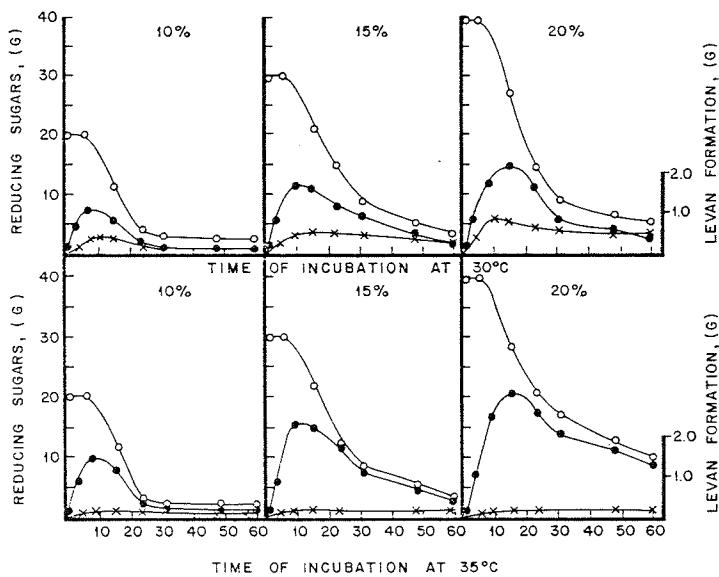


Table 2 - Analytical results after termination of fermentation of glucose and sucrose by *Z. mobilis* NRRL B-14022 at 35°C.

	Ethanol yield (%)	Total Reducing Sugars (g)	Levan formation (g)
Glucose 10%	92.0	0.80	-
Glucose 15%	82.2	3.84	-
Glucose 20%	68.5	9.76	-
Sucrose 10%	82.2	1.44	0
Sucrose 15%	77.6	2.56	0
Sucrose 20%	66.0	7.62	0

Figure 3 - Reducing sugars before and after hydrolysis of sucrose by acid during fermentation of sucrose by *Z. mobilis* NRRL B-14022.

Symbols: \bullet before hydrolysis; \circ after hydrolysis;
 \times levan (as fructose).



Acknowledgment

This work was supported by a grant from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil, (Proc. Biologia celular 83/1626-3).

References

1. Dawes, E.A. and Ribbons, D.W., Biochem. J., 98:804, 1966.
2. De Ley, J. and Swings, J., J. Syst. Bacteriol., 26:146, 1976.
3. Dische, Z. and Borenfreud, E., J. Biol. Chem., 192:583, 1951.
4. Hestrin, S., Avineri-Shapiro, S. and Aschner, M., Biochem. J., 37:450, 1943.
5. Lee, K.J., Tribe, D.E. and Roger, P.L., Biotechnol. Lett. 1:421, 1979.
6. Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E. and Roger, P.L., Biotechnol. Lett., 3:207, 1981.
7. Lyness, Ed and Doelle, H.W., Biotechnol. Bioeng., 23:1449, 1981.
8. Mortatti, M.P.L., Sato, H.H. and Park, Y.K., Biotechnol. Lett., 5:229, 1983.
9. Nelson, N., J. Biol. Chem., 153:375, 1944.
10. Park, Y.K. and Rivera, B.C., Biotechnol. Bioeng., 24:495, 1982.
11. Park, Y.K., Mortatti, M.P.L. and Sato, H.H., Biotechnol. Lett., 5:515, 1983.
12. Roger, P.L., Lee, K.J. and Tribe, D.E., Biotechnol. Lett., 1:165, 1979.
13. Somogyi, M., J. Biol. Chem., 160:61, 1945.
14. Stern, I.J., Wang, C.H. and Gilmour, C.M., J. Bact., 79:601, 1960.
15. Swings, J. and De Ley, J., Bacteriol. Rev., 41:1, 1977.

FREQUÊNCIA DE *ESCHERICHIA COLI* ENTEROPATOGÊNICA CLÁSSICA (EPEC) E
ENTEROINVASORA (EIEC) EM QUEIJO TIPO MINAS-FRESCAL DA CIDADE DE
OURO PRETO-MG

Dirceu do Nascimento
José Geraldo Sabioni
& Nair Pimenta

Recebido para publicação em 9/11/87

Deptº de Nutrição da Escola de Farmácia
Universidade Federal de Ouro Preto
35400 Ouro Preto MG, Brasil

Resumo

Verificou-se a incidência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) e enteroinvadora (EIEC), em 605 cepas de *Escherichia coli*, isoladas de 51 amostras de queijo tipo Minas frescal, da cidade de Ouro Preto-MG. A percentagem de isolamento EPEC foi de 9,8%, quando considerado o número de amostras estudadas, e de 0,8% quando considerado o número de cepas estudadas. Os sorogrupo isolados foram 086, 0127, 0125 e 026. A percentagem de isolamento de EIEC foi de 5,9% quando considerado o número de amostras estudadas, e de 2,1% quando considerado o número de cepas estudadas, o sorogruppo isolado foi 028ac.

Summary

Incidence of enteropathogenic and enteroinvasive Escherichia coli in Minas-fresco cheese from Ouro Preto, MG, Brazil

The objective of this research was to study the incidence of enteropathogenic *Escherichia coli* and enteroinvasive *Escherichia coli* in Minas-fresco cheese. The total amount of 605 strains were isolated from 51 samples of cheese bought at Ouro Preto, MG, Brazil. The isolated pathogenic strains corresponded to 9,8% of the food samples and 0,8% of the strains tested whereas the invasive type corresponded to 5,9% and 2,1%. The EPEC strains belonged to serogroups 086, 0127, 0125 and 026, and the EIEC strains to serogroups 028ac.

Introdução

Na América do Sul, a maioria das gastroenterites infantis são causadas por *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) (15). Neste grupo estão incluídas aquelas cepas de *E. coli* que pertencem aos sorogrupo 026, 055, 086, 0111, 0114, 0119, 0125, 0126, 0127, 0128, 0142 e 0158. Clinicamente, as gastroenterites com esta etiologia caracterizam-se por apresentar febre, vômito, diarréia com muco e sem sangue, tendendo a serem clinicamente mais severas que muitas outras infecções diarréicas em crianças, podendo, em alguns casos, persistir por mais de 14 dias (9).

A *Escherichia coli* enteroinvadora (EIEC), embora menos comum, provoca gastroenterites clinicamente diferentes daquelas provocadas por EPEC, ou seja, apresentam febre, fortes cólicas abdominais e diarréia aquosa, acompanhada de muco e sangue (9). A esse grupo pertencem as cepas de *E. coli* dos sorogrupo 028ac, 029, 0112ac, 0124, 0136, 0143, 0144, 0152, 0164, 0167.

Os registros da literatura a respeito da frequência de isolamento de EPEC e de EIEC em alimentos são poucos. Gelli & Cols., em 1979 (6), isolaram 5 cepas de EPEC de 125 amostras de hortaliças. Franco e Hoefel (4), em 1983, não conseguiram isolar nenhuma amostra de EPEC ou de EIEC de 68 amostras de alface. Franco & Cols. (5), em 1985, conseguiram 5 cepas de EPEC e nenhuma de EIEC entre 1351 cepas de *E. coli* isoladas de diversos tipos de alimentos. As 5 cepas isoladas neste último estudo foram detectadas em alimentos de origem animal.

O presente trabalho teve como objetivo estudar a incidência de EPEC e de EIEC em amostras de queijo tipo minas frescal, à venda na cidade de Ouro Preto-MG.

Material e Métodos

Foram isoladas 605 cepas de *Escherichia coli*, de 51 amostras de queijo Minas-frescal, da cidade de Ouro Preto-Minas Gerais, no período de 5/10/82 a 12/08/83.

Para o isolamento de *E. coli*, utilizou-se a técnica dos tubos múltiplos para coliformes fecais (11), com posterior plaqueamento em ágar MacConkey. A identificação bioquímica das cepas de *E. coli* bem como a sorotipagem por aglutinação em lâmina, foram feitas de acordo com as recomendações de Edwards & Ewing (2). Para identificação de EPEC, usam-se inicialmente os soros polivalentes A, B e C, da Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda., e posteriormente os antissoros monovalentes. Na caracterização bioquímica de *E. coli* (2), as cepas que deram resultados negativos para o teste da lisina descarboxilase, portanto suspeitas de serem cepas enteroinvadoras (12), foram submetidas a testes sorológicos para EIEC, com os soros polivalentes A e B da mesma procedência e, quando necessário, com os monovalentes correspondentes.

Resultados

No Quadro 1 estão apresentadas as freqüências de isolamento e os sorogrupos de EPEC e de EIEC das amostras de queijo tipo Minas-frescal estudadas.

Quadro 1 - Frequência e sorogrupo de EPEC e EIEC em 51 amostras de queijo tipo Minas-frescal.

	Amostras positivas		Sorogrupo
	nº	%	
EPEC	5	9,8	026, 086, 0125, 0127 (2 cepas)
EIEC	3	5,9	083ac (3 cepas)

Discussão

Os registros bibliográficos sobre a incidência de EPEC e de EIEC em alimentos, tanto no Brasil quanto em outros países, são bastante escassos, verificando-se que nestes a freqüência de isolamento destas cepas é baixa. A incidência verificada neste estudo é próxima daquela encontrada por outros autores, no Brasil. Assim, Gelli e Cols. (6), trabalhando com hortaliças, verificaram 4% de positividade para EPEC em relação ao número de amostras de hortaliças por eles investigadas. Franco e Hoefel (4), em um estudo desenvolvido com alfaces, não detectaram nenhuma cepa de EPEC ou de EIEC. Em outro estudo, de Franco e Cols. (5), realizado com uma grande variedade de alimentos, foram detectados apenas 5 cepas de EPEC e nenhuma EIEC entre 1351 cepas de *E. coli* isoladas.

Entre os sorogrupos de EPEC detectados neste trabalho (026, 086, 0125 e 0127), verifica-se que alguns deles já foram descritos em outros alimentos. Cepas do sorogrupo 026 foram isolados de escarola, por Gelli & Cols. (6), de leite pasteurizado por Franco & Cols. (5), de carne bovina crua e de fígado de porco, por Hall & Cols. (7), e de um tipo essencial de bananas, por Velaudapillai & Cols. (16).

O sorogrupo 0125 foi o que predominou entre as cepas de EPEC identificadas por Franco & Cols. (5). O sorogrupo 0127, que foi o mais isolado neste estudo, também foi isolado por Gelli & Cols. (6) e por Fantasia & Cols. (3). Não há notícia do isolamento anterior de cepas pertencentes ao sorogrupo 086. No entanto, a esse

grupo pertenciam as *E.coli* envolvidas num surto de toxinfecção alimentar na Romênia (1). Gelli & Cols. (6) detectaram cepas do sorogrupo 0119, não detectado neste estudo.

A importância epidemiológica da predominância de EPEC dos sorogrupo 026, 086, 0125 e 0127 nas amostras de queijo tipo minas frescal é discutível, visto que estes sorogrupo raramente estão associados a gastroenterites infantis, sendo, nestes casos, mais freqüentes os sorogrupo 0111 e 0119 não detectados nas amostras investigadas (13, 15).

Relativamente à EIEC, verificou-se que sua incidência nas amostras de queijo tipo minas frescal, foi de 5,9%, tendo sido isoladas 3 amostras pertencentes ao mesmo sorogrupo (028ac). Tal freqüência de isolamento é importante, uma vez que a EIEC não foi isolado anteriormente em nenhum dos estudos sobre sua incidência em alimentos (4, 5). Entretanto, é sabido que vários surtos de toxinfecção alimentar já foram associados a *E. coli* pertencentes a algum dos sorogrupo invasores. Marier & Cols. (10) isolaram *E.coli* 0124B17 num surto de toxinfecção, ocorrido nos Estados Unidos na América, causado por queijo camembert importado da França. O isolamento do sorogrupo 028ac está de acordo com o fato de este sorogrupo ser o mais importante entre as EIEC, como agente das doenças diarréicas registradas em São Paulo (15).

No entanto, as cepas do sorogrupo 028ac isoladas de queijo tipo minas frescal, não foram positivas no teste de invasão de olho de cobaio (14), o que nos levaria a concluir que essas cepas são desprovidas de patogenicidade. Porém os resultados negativos do teste biológico podem ter sido causados pelo longo período de estocagem das cepas (3 anos), antes da realização do teste.

É importante frisar que as cepas de *E. coli* objeto de nosso estudo foram isoladas seguindo a metodologia tradicional, isto é, segundo sua capacidade de fermentar lactose (8). Sabe-se, entretanto, que nem todas as cepas de *E. coli* são fermentadoras de lactose, principalmente aquelas que são pertencentes aos sorogrupo invasores (13). É provável que se a metodologia mais adequada for adotada para o isolamento de EPEC e de EIEC de alimentos, maior incidência dessas cepas possa vir a ser detectada.

Agradecimentos

Este trabalho foi realizado com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Os autores agradecem à Profª Drª Maria Regina Fernandes de Toledo, do Departamento de Microbiologia da Escola Paulista de Medicina, pela confirmação sorológica das cepas de EIEC 028ac isoladas e o teste de invasão de olho de cobaia. À Profª Mariza Landgraf e um agradecimento especial, à Profª Drª Bernadete D. de M. Franco pelo apoio que emprestaram a este trabalho, ambas do Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

Referências Bibliográficas

1. Constatin, I.D.; Voiculescu, V. & Corcea, V. - An outbreak of food poisoning in adults associated with *Escherichia coli* serotype 086:87:H34. Pathol. & Microbiol., Basel, 27:68-78, 1969.
2. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3.ed. Minneapolis, Burgess, 1972.
3. Fantasia, L.D.; Mestrandrea, L.; Schrade, J.P. & Yager, J. - Detection and growth of enteropathogenic *Escherichia coli* in soft ripened cheese. Appl. Microbiol., Washington, 29(2):179-185, 1975.
4. Franco, B.D.G.M. & Hoefel, J.L.M. - Coliformes totais, coliformes fecais e *Escherichia coli* em alfaces comercializadas em São Paulo. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 3(1):35-47, 1983.
5. Franco, B.D.G.M.; Guth, B.E.C. & Trabulsi, L.R. - Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas de alimentos. Rev. Microbiol., São Paulo, 16(1):49-55, 1985.

- 6.Gelli, D.S.; Trachibana, T.; Oliveira, I.R.; Zamboni, C.Q.; Pacheco, J.A. & Spiteri, N. - Condições higiêni-sanitárias de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, SP, Brasil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, São Paulo, 39(1):37-43, 1979.
- 7.Hall, H.E.; Brown, D.F. & Lewis, K.H. - Examination of market foods for coliform organisms. Appl. Microbiol., Washington, 15(5):1062-1069, 1967.
- 8.International Comission on Microbiological Specifications for Foods. Microrganismos in Foods: 1. Their significance and methods of enumeration. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978. 433p.
- 9.Levine, M.M. - *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic and Enteroadherent. J. Infect. Dis., 155(3):377-389, 1987.
- 10.Marier, R.; Wells, J.G.; Swanson, R.C.; Callahan, W. & Mehlman, I. - An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported french cheese. Lancet, London, 1376-1378, 1973.
- 11.Nascimento, D.; Sabione, J.G.; Pimenta, N. & Xandó, S.R. - Avaliação microbiológica de queijo tipo Minas-frescal da cidade de Ouro Preto (MG). Bol. SBCTA, Campinas, 19(2):120-129, 1985.
- 12.Silva, R.M.; Toledo, M.R.F. & Trabulsi, L.R. - Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol. 11:441-444, 1980.
- 13.Trabulsi, L.R. - Microbiologia das infecções intestinais. Rio de Janeiro, Atheneu, 1981. 135p.
- 14.Trabulsi, L.R. - Experimental kerato-conjunctivitis of the guinea-pig by enterobacteria. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 7:16-23, 1965.
- 15.Trabulsi, L.R.; Toledo, M.R.F.; Ceballos, B.S.O. & Candeias, J.A.N. - Epidemiology of diarrhoeal diseases in South America. In: Infections Diarrhoea in the Young. Amsterdam, S. Tzipori, 1985. p.121-125.
- 16.Velaudapillai, T.; Niles, G.R. & Nagaratnam, W. - *Salmonellas*, *Shigellas* and enteropathogenic *Escherichia coli* in uncooked foods. J. Hyg., Cambridge, 67:187-191, 1969.

ATIVIDADE HEMOLÍTICA DE *ACTINOBACILLUS ACTINOMYCETEMCOMITANS*

Mario Julio Avila-Campos

Luiz de Macêdo Farias

Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Carlos Américo Veiga Damasceno

& Eduardo Osório Cisalpino

Recebido para publicação em 20/11/87

Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Deptº de Microbiologia

Caixa Postal 2486

30161 Belo Horizonte MG, Brasil

Resumo

41 amostras de *A. actinomycetemcomitans*, 4 ambientais e 37 humanas isoladas e caracterizadas no laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, foram testadas quanto à capacidade hemolítica utilizando-se sangue de carneiro e humano. Foi caracterizada hemólise parcial em 34 dos 41 isolados. Destes somente 8 amostras humanas produziram hemólise em ambos os tipos de sangue, isoladas de indivíduos com doença periodontal (5) e sem doença periodontal (3). Considerando-se a relativa heterogeneidade desse grupo bacteriano, esses resultados suscitam maiores estudos sobre sua atividade hemolítica, visando a uma possível aplicação em termos de sistemática e patogênese.

Summary***Hemolytic activity of Actinobacillus actinomycetemcomitans***

Forty one strains of *A. actinomycetemcomitans* isolated from environment and from humans were tested for the hemolytic capacity using sheep and human blood. Partial hemolysis in 34 out of 41 isolated strains was detected. Only eight human strains isolated from patients with (5) and without (3) periodontal disease, produced hemolysis in both blood sources.

Considering the relative heterogeneity of this bacterial group, these results lead to further studies on its hemolytic activity, aiming a possible application in terms of systematics and pathogenesis.

Introdução

As hemolisinas são proteínas extracelulares que destroem a membrana dos eritrócitos e de outras células eucarióticas diferenciadas, sendo que esta propriedade contribui para a patogenicidade de muitos microrganismos (14).

Esta característica tem sido muito estudada em *Escherichia coli* como um marcador de virulência, onde a produção de hemolisina refletiria uma característica multifatorial de patogenicidade em determinadas amostras causadoras de infecções extra-intestinais e, particularmente, no trato urinário (8, 9).

Estudos realizados em espécies do gênero *Proteus*, têm demonstrado que em *P. mirabilis* a produção de hemolisinas é codificada cromossomicamente, enquanto que em *P. morgani* já é codificada por plasmídio, tendo-se obtido a transferência "in vivo".

do fator Hly⁺ dessa bactéria para *E. coli* e vice-versa (4, 17).

Actinobacillus actinomycetemcomitans foi descrito pela primeira vez em 1912, por Klinger (10), e isolado de infecções mistas e monomicrobianas, de diferentes quadros clínicos associados a lesões actinomicóticas, endocardites, abscessos cerebrais, infecções do trato urinário, osteomielites e particularmente de lesões periodontais (3, 7, 11, 13, 16, 18, 22).

Como constatado por alguns autores, algumas amostras de *A. actinomycetemcomitans* produziam uma potente leucotoxina capaz de destruir polimorfonucleares humanos, sugerindo que esse fator leucotóxico participaria na patogênese da periodontite juvenil localizada (20, 21).

São escassos os trabalhos que fazem referência à atividade hemolítica dos *A. actinomycetemcomitans*, sendo que as amostras humanas testadas por Slots (15) e Farias & Col. (5) não mostraram evidências de qualquer atividade.

Considerando os estudos realizados em *E. coli* e espécies do gênero *Proteus*, e a relação da atividade hemolítica com a virulência desses microrganismos, pela importância de *A. actinomycetemcomitans* na patologia humana, o presente trabalho teve como objetivo estudar a capacidade hemolítica das amostras isoladas de cavidade oral humana e de ambiente, utilizando-se dois tipos de sangue.

Material e Métodos

1.. *Amostras Testadas*: 41 isolados de *A. actinomycetemcomitans* de indivíduos com doença periodontal (D.P.), sem doença periodontal e de ambiente, e 5 de referência, foram testadas quanto a sua capacidade de hemólise com dois tipos de sangue: de carneiro e humano.

2.. *Meio de Cultura*: A base do ágar sangue foi o ágar de soja tripiticaseína, suplementado com extrato de levedura (1%), adicionando-se sangue desfibrinado de carneiro ou humano a 5%.

De uma cultura de 24 horas em meio líquido BHI-S (BHI suplementado com extrato de levedura e L-cisteína), repicava-se para as placas com ágar sangue com alça com cabo de kore, sendo posteriormente incubadas a 37°C em condições de microaerofilia (método da vela).

3.. *Leitura*: A leitura foi realizada às 24 e 48 horas de incubação, observando-se o halo de hemólise ao redor das colônias.

Resultados e Discussão

A literatura sobre a atividade hemolítica do *A. actinomycetemcomitans* é muito pobre. Alexander (1) relata a capacidade de hemólise deste microrganismo como variável em ágar sangue de carneiro para amostras isoladas de suínos, sendo ocasional, em ágar sangue de cavalo e de bovino.

A Tabela 1, apresenta a atividade hemolítica dos isolados ambientais e humanos, que foi caracterizada como hemólise parcial, nos dois tipos de sangue (carneiro e humano), em 34 isolados. Contudo, Slots (15) e Farias & Col. (5) não relataram nenhuma amostra humana hemolítica.

Por outro lado, observa-se que, das amostras isoladas hemolíticas, somente 8 hemolisaram os dois tipos de sangue testados, 3 isolados de indivíduos sem doença periodontal e 5 de pacientes com periodontite juvenil localizada. Vale ressaltar que das três amostras ambientais hemolíticas duas apresentaram-se com capacidade de hemolizar sangue de carneiro e uma outra sangue humano.

Outros autores (6) mostram que amostras de *E. coli* produtoras de hemolisinas apresentariam um caráter citotóxico, constituindo-se essa propriedade, possivelmente um dos vários fatores de virulência, sugerindo que a toxicidade seria causada pela associação bactéria-α-hemolisina e que algum contato, ou proximidade entre microrganismo e leucócitos, seria necessário para que o efeito ocorresse (2, 17).

O mecanismo de hemólise é variável, podendo ser de dois tipos: enzimático, como as fosfolipases de *Pseudomonas aeruginosa* e *Clostridium perfringens*, ou não

enzimático, como ocorre com as amostras de *S. aureus*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas hydrophilus* e *Enterobacteriaceae* (8). A literatura não faz qualquer referência ao possível mecanismo envolvido na atividade hemolítica de *A. actinomycetemcomitans*.

Os resultados obtidos na Tabela 1, sugerem a necessidade de um estudo mais amplo e detalhado, uma vez que a atividade hemolítica poderia estar relacionada à patogenicidade, como à produção de leucotoxinas, embora pesquisadores não tenham encontrado esta atividade para a amostra Y₄, caracterizada como produtora de leucotoxina (19).

Pela relativa heterogeneidade deste grupo microbiano, seriam necessários maiores estudos quanto aos tipos de hemólise, determinando-se hemolisinas específicas para grupos sanguíneos humanos e de animais, visando a uma possível aplicação em termos de sistemática e patogênese.

Por outro lado, considerando-se a possível correlação dessa atividade com outros determinantes de virulência, como a leucotoxina e a provável associação deste último à presença de fagos específicos (12), muito há, seguramente, ainda, a ser esclarecido.

Agradecimentos

Os autores agradecem à técnica de laboratório Luzia Rosa Resende, bolsista do CNPq, pela colaboração. Este trabalho foi parcialmente financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

Referências Bibliográficas

1. Alexander, A.D. - *Actinobacillus*. In: Blair, J.E.; Lennette, E.H. & Truant, J.P. eds. - *Manual of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, caps. 24, p. 220-222, 1970.
2. Da Silva, M.M.; Yamamoto, M.A. & Severo, N.P.F. - Resistência a drogas, lisogenia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênicas. *Rev. Microbiol.* 14:254-258, 1983.
3. Ellner, J.J.; Rosenthal, M.S.; Lender, P.I.; Mc Henry, M.C. - Infective endocarditis caused by slow-growing, fastidious, Gram-negative bacteria. *Medicine*. 58:145-158, 1979.
4. Emody, L.; Batai, J.; Kerenyi, M. & Voros, S. - Transfer of *E. coli* haemolysin plasmid into *Proteus morganii* in the mouse intestine. *FEMS Microbiol. Letters*. 16:35-38, 1983.
5. Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Damasceno, C.A.V.; Cisalpino, E.O. & Costa, J.E. - Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de lesões periodontais humanas. *Rev. Microbiol.* 17:296-306, 1986.
6. Gadeberg, O.V. & Orskov, I. - In vitro cytotoxic effect of α -hemolytic *Escherichia coli* on human blood granulocytes. *Infect. Immun.* 45:255-260, 1984.

Tabela 1 - Atividade hemolítica das 41 amostras de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de ambiente (4) e de humanas (34), utilizando sangue de carneiro e sangue humano.

Símbolo: * = ATCC 29522, 29523, 29524 e NCTC 9709, 9710

Origem das amostras testadas	Nº de amostras positivas		Total de amostras hemolíticas
	sangue carneiro	sangue humano	
Cuspideira	2/4	1/4	3/4
Indiv. sem D.P.	5/9	3/9	5/9
Indiv. com D.P.	26/28	5/28	26/28
Amostras de referência*	4/5	0/5	4/5
Total	37/46	9/46	38/46

7. Genco, R.J.; Van Dyke, T.E.; Park, B. & Horoszewicz, H.V. - Neutrophil chemotaxis impairment in juvenile periodontitis: evaluation of specificity, adherence, deformability and serum factors. *J. Reticuloendothel. Soc.* 28:81-91, 1980.
8. Hacker, J. & Hughes, C. - Genetic analysis of bacterial haemolysin production. *Bull. Inst. Pasteur.* 83:149-165, 1985.
9. Hacker, J.; Hughes, C.; Hof, H. & Goebel, W. - Cloned hemolysin genes from *E. coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect. Immun.* 42:57-63, 1983.
10. Klinger, R. - Untersuchungen über menschliche aktinomykose. *Centralbl. F. Bakt. I. Abt. Orig.* 62:191-200, 1912.
11. Page, M.I. & King, E.O. - Infection due to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. *N. Engl. J. Med.* 276:181-188, 1966.
12. Preus, H.R.; Olsen, I. & Gjermo, P. - Bacteriophage infection - a possible mechanism for increased virulence of bacteria associated with rapidly destructive periodontitis. *Acta Odontol. Scand.* 45:49-54, 1987.
13. Reider, J. & Wheat, J. - Endocarditis caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *South. Med. J.* 72:1219, 1979.
14. Rogolsky, M. - Nonenteric toxins of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 43:320-360, 1979.
15. Slots, J. - Salient biochemical characters of *Actinobacillus Actinomycetemcomitans*. *Arch. Microbiol.* 131:60-67, 1982.
16. Slots, J.; Reynolds, H.S. & Genco, R.J. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infect. Immun.* 29:1013-1020, 1980.
17. Smith, W. & Halls, S. - The transmissible nature of the genetic factor in *E. coli* that controls haemolysin production. *J. Gen. Microbiol.* 47:153-161, 1967.
18. Tanner, A.C.R.; Haffer, C.; Bratthall, G.T.; Visconti, R.A. & Socransky, S.S. - A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.* 6:278-307, 1979.
19. Tsai, C.C.; Mc Arthur, W.; Baehni, P.; Hammond, B. & Taichman, N.S. - Extraction and partial characterization of a leukotoxin from a plaque derived Gram-negative microorganisms. *Infect. Immun.* 25:427-439, 1979.
20. Tsai, C.C.; Shenker, B.J.; Di Rienzo, J.M.; Malamud, D. & Taichman, N.S. - Extraction and isolation of a leukotoxin from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* with polymyx B. *Infect. Immun.* 43:700-705, 1984.
21. Taichman, N.S.; Schenker, B.J.; Tsai, C.C.; Glickman, L.T.; Baehni, P.C.; Stevens, R. & Hammond, B.J. - Cytopathic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on monkey blood leukocytes. *J. Periodontol. Res.* 19:133-145, 1984.
22. Zambon, J.J.; Christersson, L.A. & Slots, J. - *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Periodontol.* 54:707-711, 1983.

ATIVIDADE BIOLÓGICA DO LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS) DE MORAXELLA BOVIS

Frutuoso Luiz de Araújo

Faculdade de Medicina Veterinária
Universidade Federal de Pelotas, RS

Recebido para publicação em 16/12/87

& Ilvan Delgado Ricciardi

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

Resumo

Foram avaliadas algumas propriedades biológicas do lipopolissacarídeo extraído de *M. bovis*. Experimentos realizados in vivo com o LPS purificado demonstraram toxicidade evidenciada pela DL₅₀ em camundongos. Lesões dermonecróticas localizadas foram detectadas pela reação de Shwartzman em coelhos albinos. Além disso, foi observada uma severa conjuntivite em camundongos que resistiram ao desafio intraperitoneal com o LPS sugerindo, desse modo, um importante mecanismo predispondo à penetração de *M. bovis* na mucosa conjuntiva.

Summary

The biological properties of lipopolysaccharide extracted from *M. bovis* were evaluated. In vivo, tests of purified LPS demonstrated toxicity assayed by DL₅₀ in mice. Localized dermonecrotic lesions were detected through local Shwartzman reaction in albino rabbits. It was also observed a severe conjunctivitis in mice which resisted the intraperitoneal challenge thus showing the action of LPS in the conjunctival mucosa and suggesting an important mechanism predisposing the penetration of *M. bovis*.

Introdução

Moraxella bovis é o agente etiológico da ceratoconjuntivite infecciosa bovina (C.I.B.), enfermidade ocular de manifestação rápida, caracterizada pela inflamação da córnea e da conjuntiva (10, 1, 5). As perdas econômicas não estão calculadas para o Brasil, mas no Rio Grande do Sul, pelo menos, é substancial o número de casos notificados. Nos Estados Unidos, esta moléstia é responsável por um prejuízo anual superior a 150 milhões de dólares (15). São considerados fatores predisponentes da doença a poeira, os ventos e os insetos (9) bem como a ação dos raios ultra-violeta, no verão, o que causa irritação da mucosa ocular facilitando a invasão do microrganismo no epitélio da córnea (7, 15). Entretanto, fatores intrínsecos à *M. bovis*, como capacidade de aderência, invasão e multiplicação são determinantes no estabelecimento da C.I.B. bem como a participação de exo e

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da UFRJ, com auxílio do CNPq, FINEP e CEPG da UFRJ.

endotoxinas (6, 4). Em relação a estas últimas, estudos realizados mostram um entendimento cada vez mais detalhado acerca da estrutura química, biosíntese e ação biológica das moléculas de lipopolissacarídeo (LPS) extraído de um bom número de bactérias (13, 2). No gênero *Moraxella* contudo, as informações inexistem e, com relação a *M. bovis*, em particular, seria extremamente importante o conhecimento da atividade biológica de seu LPS. Este trabalho visa apresentar alguns resultados de investigações sobre o assunto.

Material e Métodos

Cepa bacteriana - Foi utilizada a amostra JUR₂P₅ de *M. bovis* isolada no Rio Grande do Sul do saco conjuntival de bovino acometido de C.I.B.

Cultivo e colheita do organismo - *M. bovis* foi cultivada em Caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI - Difco) adicionado de ágar (2%) e sangue desfibrinado de carneiro (7%). Para obtenção de massa celular, balões com 2 litros de B.H.I. foram inoculados com 2ml de pre-inóculo obtido após crescimento por 6 horas a 37°C. Os balões, após inoculação, foram incubados com agitação (160rpm) por 24hs a 37°C. Após o cultivo a massa bacteriana foi separada por centrifugação a 7410 X g durante 10 minutos em aparelho Sorval modelo RC-2B refrigerado (4°C), e lavada 2 vezes em solução salina tamponada com fosfatos (PBS) pH 7,4.

Isolamento do LPS - A extração e purificação de LPS foi realizada seguindo-se a técnica recomendada por Stead & Cols. (14) e pormenorizada em trabalho anterior (3).

Endotoxina padrão - Uma preparação comercial da endotoxina de *Escherichia coli* O₁₁₁B₄, foi obtida do Laboratório Difco.

Caracterização biológica do LPS

A) **Letalidade para camundongos (DL₅₀)** - Camundongos "outbread" de 4 semanas pesando de 25 a 30g foram divididos em grupos de 6 animais e desafiados intraperitonealmente com solução aquosa de LPS variando de 500 a 62,5µg/ml. Um lote, inoculado pela mesma via com salina estéril serviu de controle. O número de mortos foi registrado após 48 horas de observação e a DL₅₀ calculada pelo método de Reed & Muench (12). Paralelamente foram feitos testes com LPS de *E. coli* O₁₁₁B₄ comparando-se os efeitos biológicos.

B) **Reação de Shwartzman local** - Foram utilizados 2 coelhos brancos, machos, pesando aproximadamente 2Kg cada um. Os animais foram inoculados intradermicamente em vários locais no dorso previamente depilado, com doses sensibilizantes de LPS variando de 500mg a 1µg/0,1ml. Metade do dorso recebeu doses de LPS de *M. bovis* e, a outra, doses do LPS de *E. coli* O₁₁₁B₄. Decorridas 18 horas os coelhos foram inoculados intravenosamente com 10mg de LPS de *E. coli* O₁₁₁B₄ como dose desencadeante. Os animais foram observados durante 3 dias, para registro do aparecimento de eritema e/ou necrose característica.

Resultados

A DL₅₀ calculada para o LPS purificado extraído de *M. bovis* foi de 250mg (Tabela 1). A mesma metodologia mostrou ser de 187,5µg a DL₅₀ calculada para *E. coli* O₁₁₁B₄ utilizada como padrão referencial. Além disso, foi observada uma severa conjuntivite nos animais sobreviventes ao desafio intraperitoneal com o LPS de *M. bovis* (Figura 1).

Os resultados da reação de Shwartzman local induzida pelos LPS de *M. bovis* e *E. coli* O₁₁₁B₄ estão apresentados na Figura 2. Após 6 a 18 horas da inoculação da dose desencadeante, constatou-se hemorragia e necrose nos pontos de inoculação intradérmica. A dose mínima necessária para a indução da reação com LPS de *M. bovis* foi de 2µg, inferior à dose mínima necessária para a indução com LPS de *E. coli* O₁₁₁B₄, igual a 8µg.

Tabela 1 - Determinação da DL₅₀ do LPS de *M. bovis* inoculado por via intraperitoneal em camundongos após observação por 48 horas.

$\mu\text{g}/\text{ml-LPS}$ <i>M. bovis</i>	Mortos	Sobreviventes	Resultados acumulados			
			Mortos	Sobreviventes	Total	% Mortos
500	4/6	2	9	2	11	81,81
250	3/6	3	5	5	10	50,00
125	1/6	5	2	10	12	16,66
62,5	1/6	5	1	15	16	6,25
Controle	0/6	6				

Figura 1 - Conjuntivite provocada pelo lipopolissacarídeo de *Moraxella bovis* em camundongo jovem inoculado por via intraperitoneal com dose de 250 μg de LPS.



Discussão

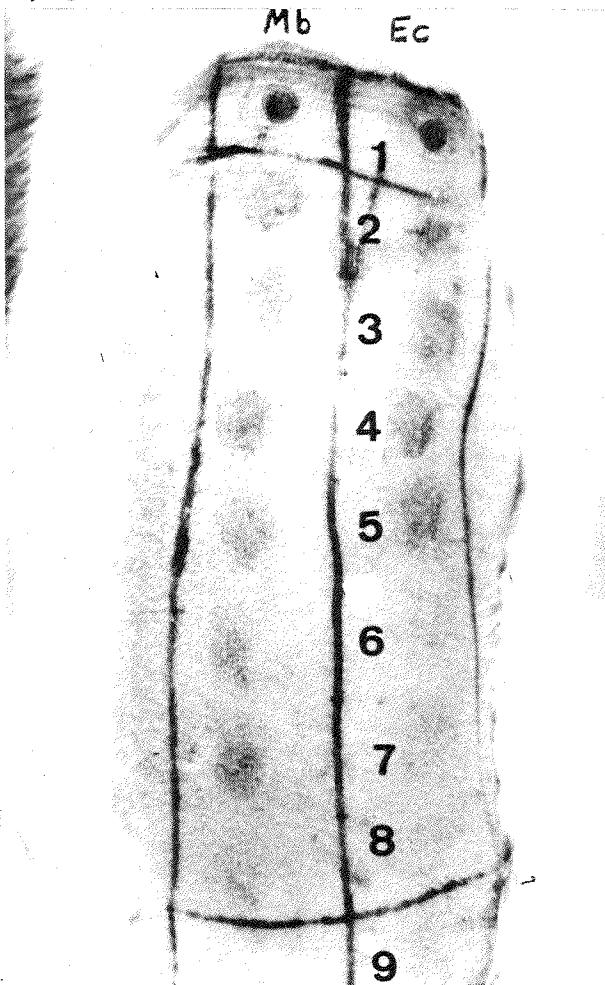
O potencial de virulência ficou patente nos resultados encontrados para a toxicidade do LPS de *M. bovis* tanto na verificação da DL₅₀ em camundongos como na indução da reação de Shwartzman em coelhos. A DL₅₀ de 250 μg encontrada é semelhante a descrita para o lipopolissacarídeo de outros patógenos como por exemplo 250 μg para *E.coli* O₁₁₁B₄, 274 μg para *C.jejuni* e 225 μg para *V.enterocolitica* O₃, (3), além de 230 μg para *E.coli* O₁₁₁B₄ (8).

Por outro lado, o surgimento de regiões necrosadas e hemorrágicas características da reação de Shwartzman com a dose mínima de 2 μg demonstram o potencial endotóxico do LPS. Em termos comparativos, vale destacar que reações semelhantes somente são obtidas com doses de 8 μg , 5 μg e 50 μg de LPS provenientes de *E.coli* O₁₁₁B₄, *V.enterocolitica* O₃ e *C.jejuni* respectivamente (3). Contudo, cabe notação especial a verificação de conjuntivite, com forte derrame lacrimal, em camundongos desafiados com doses sub-letais de LPS. Em trabalho realizado em 1973, Pugh & cols. (11) comunicaram que frações celulares de *M.bovis* eram capazes de induzir conjuntivite em camundongos e cobaias previamente irradiados com luz ultra-violeta, mas não conseguiram precisar que mecanismos estavam envolvidos em tais alterações. Os resultados observados em nosso trabalho quando o LPS de *M.bovis* foi administrado

intraperitonealmente permitem especular que as observações de Pugh & Cols. (11) possam ver vinculadas à fração lipopolissacarídeca do microrganismo. A verificação desta possibilidade em bovinos está sendo atualmente programada pelos autores.

Figura 2 - Reação de Shwartzman local em coelhos inoculados com doses variadas de lipopolissacarídeo extraído de *Moraxella bovis*.

Símbolos: Mb-LPS de *M. bovis*; Ec-LPS de *E. coli*; 1 (125 μ g); 2 (62,5 μ g); 3 (31,25 μ g); 4 (15,6 μ g); 5 (7,8 μ g); 6 (3,9 μ g); 7 (1,9 μ g); 8 (0,9 μ g) e 9 (salina).



Referências Bibliográficas

1. Baptista, P.J.H.P. - Infectious bovine keratoconjunctivitis: A Review. Brit. Vet. J., 135:225-242, 1979.
2. Bradley, S.G. - Cellular and molecular mechanisms of action of bacterial endotoxins. Ann. Rev. Microbiol., 33:67-94, 1979.
3. Branquinho, M.R.; Alviano, C.S. & Ricciardi, I.D. - Determinação da composição química e ação biológica do lipopolissacarídeo (LPS) de *Campylobacter fetus* ss. *jejuni*. Rev. Microbiol. (São Paulo), 14(2):90-96, 1983.

4. Chandler, R.L.; Baptista, P.J.H.P. & Turfrey, B. - Studies on the pathogenicity of *Moraxella bovis* in relation to infectious bovine keratoconjunctivitis. *J. Comp. Path.*, 91:175-184, 1981.
5. Fraser, J. & Gilmour, N.J.L. - The identification of *Moraxella bovis* and *Neisseria ovis* from the eyes of cattle and sheep. *Res. Vet. Sci.*, 27:127-128, 1979.
6. Henriksen, S.D. - *Moraxella*, *Neisseria*, *Branhamella* and *Acinetobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.*, 30:63-83, 1976.
7. Hughes, D.E. & Pugh, G.W.Jr. - A five year study of infectious bovine keratoconjunctivitis in beef heard. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 157:443-451, 1970.
8. Nowotny, A. - Chemical and biological heterogeneity of endotoxins. In: Weinbaum, G.; Kadis, S. & Ajl, S.J. Eds. - *Microbial toxins*. New York, Academic Press, V. 4, chap. 7, p. 309-329, 1971.
9. Pugh, G.W.Jr. & Hughes, D.E. - Bovine infectious keratoconjunctivitis: carrier state of *Moraxella bovis* and the development of preventive measures against disease. *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, 167:310-313, 1975.
10. Pugh, G.W.Jr. & Hughes, D.E. - Experimental production of infectious bovine keratoconjunctivitis: Comparison of serological and immunological responses using pili fractions of *Moraxella bovis*. *Can. J. Comp. Med.*, 40:60-66, 1976.
11. Pugh, G.W.Jr., Hughes, D.E. & Schulz, V.D. - The pathophysiological effects of *Moraxella bovis* toxins on cattle mice and guinea pigs. *Can. J. Comp. Med.*, 37:70-73, 1973.
12. Reed, L.J. & Muench, H. - A simple method of estimating 50% end points. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
13. Rietschel, E. - Chemical structure and biological activity of endotoxins (lipopolysaccharides) and lipid A. *Arch. Pharmacol.*, 287:73-84, 1975.
14. Stead, A.; Main, J.S.; Ward, M.E. & Watt, P.J. - Studies on LPS isolated from strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Gen. Microbiol.*, 88:123-131, 1975.
15. Troutt, H.F. & Schurig, G. - Pinkeye. *Anim. Nutr. & Hlth.*, 2:38-41, 1985.

THERMOPHILIC DEGRADATION OF CELLULOSE BY CLOSTRIDIUM THERMOCELLUM

Francisco Maugeri Filho

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Engenharia de Alimentos
13100 Campinas SP, Brasil

Recebido para publicação em 26/01/88

&. G. Goma

Laboratoire de Genie Biochimique
ERA CNRS n° 379 - INSA
31077 Toulouse, França

Summary

The growth of *Clostridium thermocellum* is studied on cellulosic substrates at different pH and operating conditions. Agitation is necessary and low pH favours the production of neutral metabolites (ethanol). Addition of 0,4g/l of dimethyl-acetamide (DMA) enhances the production of metabolites and cellulolytic enzymes.

Resumo

Degradação termofílica de celulose com Clostridium termocellum.

O crescimento de *Clostridium thermocellum* é estudado em substratos celulósicos, em diferentes valores de pH e condições de operações. A agitação do meio é necessária e valores baixos de pH favorecem a produção de metabólicos neutros (etanol). A adição de 0,4g/l de dimetil-acetamida (DMA) aumenta a produção de metabólicos e enzimas celulolíticas.

Introduction

Thermophilic cellulose-fermenting bacteria may play an important role in the degradation of cellulosic materials and production of ethanol. Mac Bee (11) was the first to isolate a thermophilic cellulose-fermenting bacterium. The microorganism, *Clostridium thermocellum*, was able to utilize cellulose, cellobiose and xylose as substrate. Some other organisms with similar characteristics were isolated, but all of them showed differences regarding substrate utilization. The LQ8 (13) and ATCC 27405 (15) strains were unable to utilize glucose, xylose, sucrose or trehalose as carbon sources. On the other hand, M7 spp. isolated by Lee and Blackburn (8) utilizes glucose and some other mono and disaccharides. It was found by Shinmyo & Col. (15) that high concentrations of yeast extract enhance the consumption of glucose and fructose.

Ethanol, acetic acid, reducing sugars, hydrogen and carbon dioxide are the principal products detected during the fermentation of cellulose by *Clostridium thermocellum* (5, 7).

Higher yields of ethanol production were obtained by the utilization of an ethanol resistant *Clostridium thermocellum* strain (17) or by the utilization of mixed cultures of *C. thermocellum* and *C. thermohydrosulfuricum* (19). Mixed cultures have also been used for the production of acetic acid (17) and methane (18).

Materials and Methods

Microorganism: *C. thermocellum* ATCC 27405 maintained in roll tubes as described by Hungate (6).

Fermentation medium: Medium CM3 as described by Weimer and Zeikus (18). The carbon sources utilized were cellulose Whatman CC41 or sugar cane bagasse. The latter was pre-treated as shown in Figure 1.

Figure 1 - Treatment performed on sugar cane bagasse

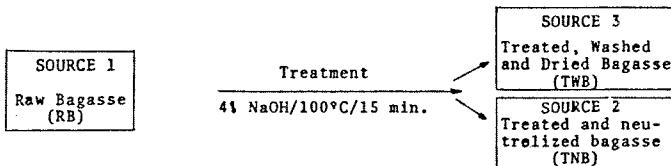
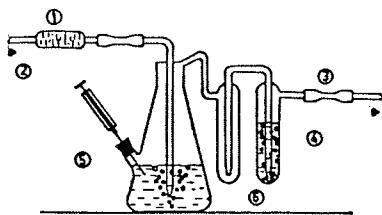


Figure 2 - Anaerobic flask.
Symbols: 1 = Glass wool filter; 2 = Gas inlet; 3 = Gas exit; 4 = Protection against oxygen (pyrogallol potassic solution); 5 = Inoculum or samples; 6 = Culture protection tube.



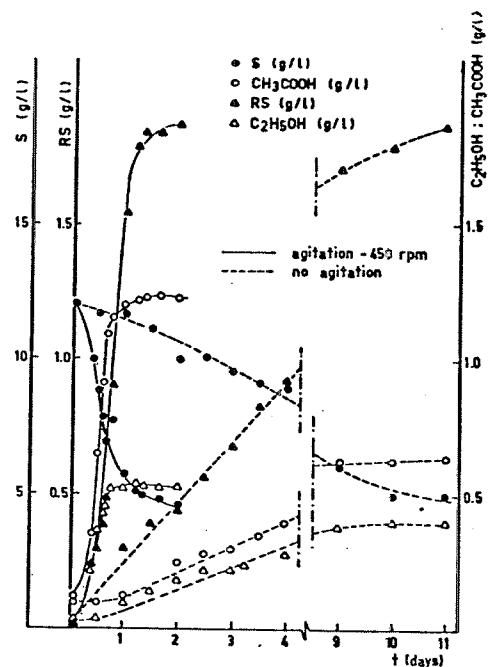
Microbial culture: The microorganism was maintained by weekly inoculation in a fresh CM3 medium. The inoculations were performed with sterile hypodermic syringes. The flask developed by Daniel and Zeikus (4), modified in order to eliminate the continuous gassing of nitrogen (Figure 2), was used for growth of *C. thermocellum*.

After inoculation on CM3 medium, the cultures were incubated at 60°C in a still bath.

Preparation of inoculum: The inoculum was prepared in the anaerobic flasks in the conditions described above. The incubation time was controlled through the amount of gas produced (40ml per gramme of cellulose).

Fermenter conditions: All fermenter trials were performed with 3.5 liters of medium. The pH, when controlled, was maintained at 6.0, 6.5, 7.0 and 7.5 with 25%

Figure 3 - Effect of agitation on the production by *C. thermocellum*.
Symbols: RS = Reducing sugars; S = Substrat.



NaOH addition. The fermentation were carried out at 60°C at 450 RPM or without agitation. The fermentation time was about 2 days with agitation or about 11 days without agitation.

Analytical methods: Residual cellulose was determined by the gravimetric method described by Gordon & Col. (5). Acetic acid and ethanol were determined at the same time by a gas chromatograph, using propionic acid as internal standard. (Oven temperature 150°C, injector 220°C, detector 180°C, column 500 x 4mm, Porapak Q 80-100 mesh).

Reducing sugars were measured by the DNS method (12). Enzymatic activities were measured by the method described by Mandels (9). The percentage of degraded substrate was estimated by the relation $\phi = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100$, where S_0 is the initial dry weight and S_f is the final dry weight of cellulosic material.

Results and Discussion

As shown in Figure 3, the fermentation time was shortened from 11 days to 2 days when the cultures were agitated at 450 rpm. These results disagree with the ones obtained by Weimer & Col. (18), who found that *C. thermocellum* culture was badly affected by agitation. Also, the concentrations of acetic acid and ethanol were increased 30% and 90% respectively on the agitated cultures.

Figure 4 - Effect of pH on the production by *C. thermocellum*.

Symbols: P = Products; ΣP = Total amount of products; $\Sigma P/\phi S_0$ = Products yield related to degraded cellulose.

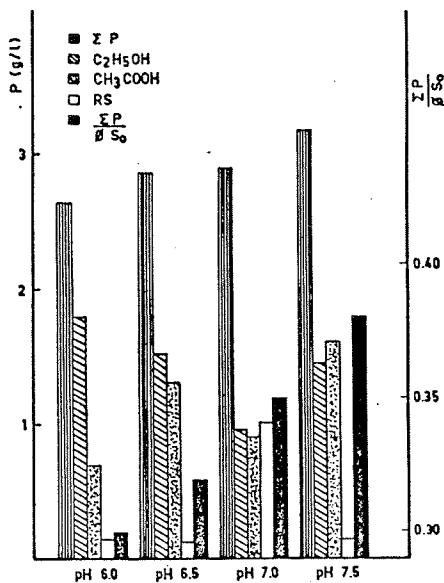
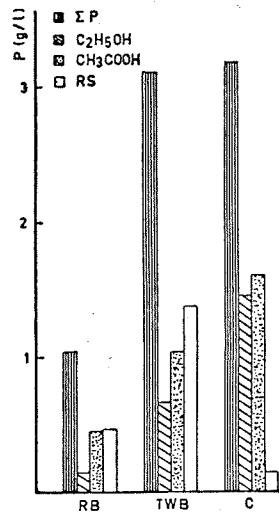


Figure 5 - Degradation of differents cellulosic materials.

Symbols: RB = Raw bagasse 10g/l; TWB = Treated washed bagasse 10g/l; C = Whatmann CC 41 cellulose 10g/l.



The pH influence on cellulose degradation is shown in Figure 4. The total amount of products is increased as the pH is increased and at lower values the production of neutral metabolites (ethanol) is favoured. The ratio ethanol/acetic acid changes from 0.83 at pH 7.5 to 2.56 at pH 6.0. The amount of degraded cellulose was not significantly changed.

On the experiment with different cellulosic materials, *C. thermocellum* was not able to grow on treated and neutralized bagasse (TNB).

Figure 5 shows the effect of the different substrates on the *C. thermocellum* metabolism. The amount of ethanol, acetic acid and reducing sugars from treated bagasse (TWB) are higher than from raw bagasse (RB). Production of acetic acid and ethanol from cellulose (C) were higher than from treated bagasse. On the other hand, the accumulation of reducing sugars is higher from TWB.

Table 1 shows the total amount of products and the percentage of degraded substrate, when *C. thermocellum* grew on different cellulosic materials. The treatment of bagasse was quite favorable for the cellulose degradation, about 50% more than raw bagasse, and the total accumulation of products (3.09g/l) was sensibly close to the total obtained from cellulose (3.18g/l).

According to Philipp & Col. (14) and Turbak & Col. (16) the dimethyl-acetamide (DMA) has a strong solubilization action on cellulose.

Al Ani (3) found that 0.4g/l of DMA favoured the growth and the cellulase production by molds. In order to study the influence of a such product on the growth of *C. thermocellum* 0.4g/l of DMA was added to the culture medium. Figure 6 shows the results obtained in this experiment. The addition of DMA increased the accumulation of reducing sugars from 0.2g/l to 1.6g/l. The amount was 8 fold higher, although the percentage of degraded substrate was the same in both cases (about 65%). The amount of acetic acid and ethanol did not change significantly.

The influence of pH and DMA addition on the enzymatic activities were also studied. In all experiments β -glucosidase activity was absent in the medium fermentation. These results agree with the work of Aid & Col. (1) who found that β -glucosidase of *C. thermocellum* is located in the periplasmic space of the cells.

Table 2 shows the maximum values of CMC or endo-glucanase activity and total or filter paper (F.P.) activity as a function of pH. The CMC activity was favored by the increase in the pH although the FP activity was not affected.

Figure 7 shows the influence of DMA addition on the cellulase activity and reducing sugars production during the growth of *C. thermocellum* on cellulose. The total cellulase activity (FP) and reducing sugars enhanced while endo-cellulase activity was lower.

Conclusions

C. thermocellum was studied on the cellulosic materials transformation since this organism can develop very fast on these substrates - the rate is comparable to the fastest aerobic microorganisms. So, by using this process it could be possible to reduce the degradation time of cellulose and to employ the products for fuels or SCP production (10).

C. thermocellum degrades purified cellulose fairly well. However, its action is very deficient on native cellulose. A pretreatment is necessary in order to reduce the amount of hemicellulose and lignine.

In regard to the technological aspects of fermentation by *C. thermocellum*, agitation at 450 rpm is favorable to enhance the rate of cellulose degradation. The

Table 1 - Total amount of products (P) and percentage of degraded substrates (ϕ)

	P (g/l)	ϕ (%)
RB	1.45	20
TWB	3.09	69
C	3.18	82

Figure 6 - Effect of DMA addition on the cellulose degradation.

Symbols: A = Without DMA; B = With DMA 0,4g/l.

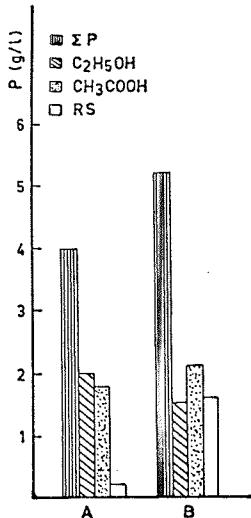


Table 2 - Maxima endo-glucanase (CMC) and total cellulase (FP) activities as a function of pH.

pH	6.0	6.5	7.0	7.5
CMC (UI/ml)	0.15	0.23	0.44	0.97
FP (UI/ml)	0.09	0.13	0.13	0.14

microorganism was completely inhibited at pH below 5.5. Also the pH affected the ratio ethanol/acetic acid from 0.85 at pH 7.5 to 2.56 at pH 6.0.

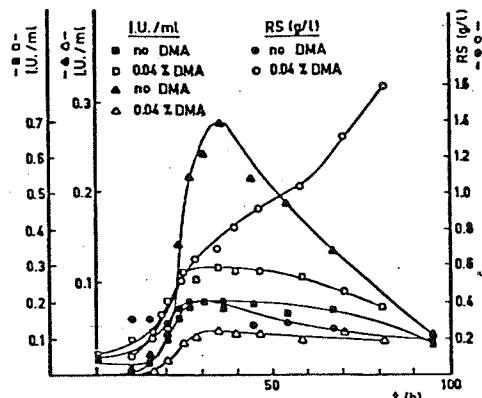
The enzymatic activities during fermentation are influenced by the pH of culture and the maxima were obtained at pH 7.5.

The use of DMA increased the total cellulolytic activity and the amount of reducing sugars. The DMA action could be linked with the favorable and simultaneous effect on the growth and production of cellulases and also in the changes of the cellulose structure (2).

References

1. Ait, N.; Creuzet, N. & Cattaneo, J. - Characterization and purification of thermostable β -glucosidase from *Clostridium thermocellum*. Biotechnol. Biophys. Res. Commun. 90:537-546, 1979.
2. Al Ani, D.; Maugeri FQ, F. & Goma, G. - Effects d'adjuvants sur les croissances microbiennes sur substrates cellulaires Colloquy "Cellulolyse Microbienne", Marseille, France, 1980.
3. Al Ani, D. - Doctorat d'Etat Thesis, INSA-Toulouse, France 1980.
4. Daniels, L. & Zeikus, J.G. - Improved culture flask for obligate anaerobes. Appl. Microbiol., 29:710-711, 1975.
5. Gordon, J.; Jimenez, M.; Cooney, C.L. & Wang, D.I.C. - Sugar accumulation during enzyme hidrolisis and fermentation of cellulose. AICHE Symposium Series, 74:91-97, 1978.
6. Hungate, R.E. - A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: Methods in Microbiology, J.R. Harris and D.W. Ribbons, eds. vol.3B, pp.117-132, Academic Press, NY, USA, 1969.
7. Jimenez, M.; Gordon, J.; D.I.C. & Cooney, C.L. - Cellulose degradation using thermophilic and anaerobic microorganism. 174th Am. Chem. Soc. Nat. Meeting, Chicago, USA, 1977.
8. Lee, B.H. & Blackburn, T.H. - Cellulase production by a *Thermophilicum clostridium* species. Appl. Microbiol., 30:346-353, 1975.
9. Mandels, M. - Bioconversion of cellulosic materials into energy, chemicals, and microbial protein. International Course-Cum. Symposium, New Delhi, India, 1977.
10. Maugeri FQ, F. - Docteur Ingenieur Thesis, INSA, Toulouse, France, Etude d'une nouvelle voie de production de biomasse microbienne a partir de cellulose, 1980.
11. Mc Bee, R.H. - The culture and physiology of a thermophilic cellulose-fermenting bacterium. J. Bacteriol., 56:653-663, 1948.
12. Miller, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem., 31:426-428, 1959.
13. Ng, T.K. Weimer, P.J. & Zeikus, J.G. - Cellulolytic and physiological properties of *Clostridium thermocellum*. J. Appl. Microbiol., 114:1-7, 1977.

Figure 7 - Effect of DMA addition on the production of cellulolytic enzymes by *C. thermocellum*. Symbols: Δ = CMC activity; \blacksquare = FP activity.



14. Philipp, B.; Scheicher, H. & Wagenknecht, W. - Non aqueous solvents of cellulose. *Chemtech*, 7:702-709, 1977.
15. Shinmyo, A; Garcia-Martinez, O.U. & Dermain, A.L. - Studies on the extracellular cellulolytic enzyme complex produced by *Clostridium thermocellum*. *J. Appl. Biochem.*, 202-209, 1979.
16. Turbak, A.F.; Hammer, R.B.; Davies, R.E. & Hergert, N.L. - Cellulose solvents. *Chemtech*, 10:51-57, 1980.
17. Wang, D.I.C.; Cooney, C.L.; Wang, S.D.; Gordon, J. & Wang, G.Y. - Anaerobic Biomass degradation to produce sugars, fuels and chemicals. Proceedings of the 2nd Ann. Symp. on Fuels from Biomass, N.Y., USA, 1978.
18. Weimer, P.J. & Zeikus, J.G. - Fermentation of cellulose and cellobiose by *Clostridium thermocellum* in the presence and absence of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33:289-297, 1977.
19. Zeikus, J.G.; Ng, T.K.; Lamed, R. & Bassat, A.B. - Microbiol fuel and enzyme production via thermophilic fermentation of biomass. 2nd International Course Cum. Symposium on Bioconversion and Biochemical Engineering, New Delhi, India, 1980.

DEFINIÇÃO DE UM MEIO DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE CELULASES POR BOTRYTIS SP

Edmar das Mercês Penha

Deptº de Química Tecnológica

Instituto de Química UERJ

20550 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Recebido para publicação em 7/05/87

José Augusto Rosemberg

Deptº de Engenharia Bioquímica

Escola de Química UFRJ

Cidade Universitária, Ilha do Fundão

21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

& Maurício Moura da Silveira

Centro de Biotecnologia

Fundação de Tecnologia Industrial

12600 Lorena SP, Brasil

Resumo

O fungo termofílico do gênero *Botrytis* (cepa EQ-55), isolado de solo, foi testado no meio de Mandels & Reese (4), com tamponamento em valores de pH de 5,5 a 8,0, mostrando-se capaz de gerar preparações celulolíticas em exo-glucanase (C_1) e endo-glucanase (C_x) com altas atividades. Modificações no referido meio indicaram que peptona mostra-se a mais adequada fonte de nitrogênio dentre as testadas, levando a um aumento de atividade em C_1 de aproximadamente duas vezes, independendo de tamponamento. Em experiências comparativas com a cepa mesofílica *Trichoderma reesei* QM-9414 foi constatado que no meio contendo peptona como única fonte de nitrogênio, a cepa EQ-55, a 37°C, desenvolve atividade em C_1 cerca de doze vezes maior do que *T. reesei* QM-9414.

Summary

Cellulase production by Botrytis sp.: a culture medium definition

The cellulolytic activity of a thermophilic filamentous fungus (strain EQ-55), isolated from a soil sample and classified as belonging to the Genus *Botrytis*, was tested in Mandels and Reese medium (4), at pH values ranging from 5.5 to 8.0. The cellulolytic complex formed was found to be highly active in C_1 and C_x components. Peptone in a modified medium was the best nitrogen source among those tested, causing a two-fold increase in C_1 activity, regardless of buffering. Experiments carried out with mesophilic strain *Trichoderma reesei* QM-9414 showed that in the medium containing peptone as the only nitrogen source the strain EQ-55, at 37°C, generates a C_1 activity twelve times greater than that produced by the control strain *T. reesei* QM-9414.

Introdução

O isolamento e estudos preliminares de um fungo termofílico com atividade celulolítica (Arquivo da E.Q./U.F.R.J., nº 55), gênero provável *Botrytis*, produtor de celulases com atividade cerca de cinco vezes maior, a 37°C, que *Trichoderma reesei* QM-9414 a 30°C (9), estimulou a continuidade dos estudos com este fungo, haja visto as baixas taxas de conversão a partir de preparações celulolíticas obtidas de grupos mesofílicos (2). Neste trabalho visou-se, especificamente, verificar a influência de parâmetros como pH e fontes de nitrogênio na atividade celulolítica da cepa EQ-55.

Inicialmente, foi feito o tamponamento do meio formulado por Mandels & Reese (4), em valores de pH entre 5,5 e 8,0 - faixa de variação do meio não tamponado nas fermentações conduzidas com a cepa EQ-55 (9) - em intervalos de 0,5 unidades. Em seguida, foi estudada a influência das três fontes de nitrogênio (peptona, uréia e sulfato de amônio) existentes de forma combinada no referido meio de produção (4). Os testes foram realizados utilizando cada uma delas isoladamente e por combinação duas a duas. Finalmente, foi estabelecida uma comparação entre a cepa EQ-55 e *T. reesei* QM-9414, no valor de pH e meio de cultura mais apropriados para a produção de celulases.

Material e Métodos

Microrganismos - *Botrytis* sp. (Arquivo da E.Q./U.F.R.J., nº 55) e *Trichoderma reesei* QM-9414 (ATCC) (1).

Meio de manutenção e de preparo de inóculo - Gelose batata, de acordo com as normas descritas pelo ATCC (1). Os inóculos foram preparados segundo a técnica relatada por Mandels & Col. (5).

Meio de cultivo - Para produção de celulases (4), apresentando a seguinte composição (g/l): celulose cristalina Whatman nº 1, 10,0; peptona de carne, 1,0; uréia, 0,3; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,4; KH_2PO_4 , 2,0; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,3; CaCl_2 , 0,3; solução de microelementos, 1,0ml e água destilada q.s.p., 1,0 litro.

Solução de microelementos (mg/ml) - $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1,56; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,0; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,0; ZnCl_2 , 1,67; HCl (19%), 1,0ml e água destilada q.s.p., 1,0 litro.

Meios de cultivo modificados - Apresentando as seguintes composições em fontes de nitrogênio, únicas alterações em relação ao meio base (4) (g/l): (A) peptona de carne, 10,34; (B) uréia, 1,05; (C) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,28; (D) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,51 e uréia, 0,36; (E) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,95 e peptona de carne, 2,50; (F) peptona de carne, 4,19 e uréia, 0,63.

Determinações quantitativas - Açúcares redutores totais (ART), pelo método do DNS (7). Atividades celulolíticas de acordo com a técnica relatada por Mandels & Col. (5). Celulose residual, pelo método Semimicro (10).

Os ensaios foram conduzidos em frascos de Erlenmeyer de 500ml de capacidade, contendo 100ml de meio, em triplicata, e em agitador recíproco (amplitude de 1,4 cm e frequência de 110 batimentos por minuto) em câmara incubadora a 37°C. A preparação dos inóculos foi feita por suspensão do cultivo, no próprio meio de produção, crescidos em tubos contendo gelose batata, por 7 dias e incubados a 30 e 37°C, respectivamente, para *T. reesei* QM-9414 e a cepa EQ-55.

Resultados e Discussão

As Tabelas 1 e 2 mostram que a cepa EQ-55, a 37°C, é capaz de desenvolver maiores atividades em exo-glucanase (C_1) e em endo-glucanase (C_x), cerca de seis e doze vezes, respectivamente, do que *T. reesei* QM-9414, a 30°C, no meio base de produção

Tabela 1 - Parâmetros referentes a produção de celulases pela cepa EQ-55, a 37°C, no meio base (4).

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	5,5	6,5	6,5	7,0	7,0
C ₁ (UI)	0	0,163	0,393	0,640	0,593	0,461
C _X (UI)	0	0,996	3,093	3,685	3,630	2,133
Celulose (g/100ml)	1,00				0,60	

Tabela 2 - Parâmetros referentes a produção de celulases por *T. reesei* QM-9414, a 30°C, no meio base (4).

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	6,0	6,0	6,5	7,0	7,0
C ₁ (UI)	0	0,003	0,035	0,098	0,116	0,104
C _X (UI)	0	0,007	0,489	0,924	1,289	1,356
Celulose (g/100ml)	1,00					0,82

Tabela 3 - Atividades celulolíticas máximas em relação ao pH de tamponamento do meio base (4), com tampão fosfato, após 72 horas de fermentação com a cepa EQ-55, a 37°C.

Atividades (UI)	pH de tamponamento						
	livre	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
C ₁	0,64	0,56	0,60	0,65	0,64	0,61	0,71
C _X	3,69	5,22	5,28	6,11	5,96	6,26	5,96

Tabela 4 - Parâmetros referentes a produção de celulases pela cepa EQ-55, a 37°C, no meio modificado contendo peptona como único substrato nitrogenado.

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	6,0	7,5	8,0	8,0	8,0
C ₁ (UI)	0	0,116	0,148	1,203	0,830	0,733
C _X (UI)	0	2,000	3,867	7,037	7,052	6,044
Celulose (g/100ml)	1,00					0,70

Tabela 5 - Parâmetros referentes a produção de celulases pela cepa EQ-55, a 37°C, no meio modificado contendo uréia como único substrato nitrogenado.

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	5,5	7,0	8,0	8,0	8,0
C ₁ (UI)	0	0,044	0,261	0,498	0,569	0,474
C _X (UI)	0	0,933	2,889	4,852	5,111	3,519
Celulose (g/100ml)	1,00				0,62	

Tabela 6 - Parâmetros referentes a produção de celulases pela cepa EQ-55, a 37°C, no meio modificado contendo sulfato de amônio como único substrato nitrogenado.

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	5,5	5,5	5,5	5,5	5,5
C ₁ (UI)	0	0	0	0	0	0
C _X (UI)	0	0	0	0	0	0
Celulose (g/100ml)	1,00					0,95

(4), com consumo de celulose de 40 e 18%, respectivamente.

O tamponamento do meio base (4), com tampão fosfato, em valores de pH de 5,5 a 8,0, não implicou em alterações significativas na produção de atividades em C₁, embora tenha provocado um aumento considerável em C_X (Tabela 3), evidenciando ser desnecessário o tamponamento do meio de produção para a cepa EQ-55, no que diz respeito a atividade em C₁.

Nas experiências conduzidas nos meios modificados, contendo uma única fonte de nitrogênio e sem tamponamento, foi observado que usando peptona, as máximas atividades atingidas após 72 horas de fermentação foram 1,203 UI em C₁ e 7,037 UI em C_X (Tabela 4). No meio contendo uréia, foram atingidos os valores de 0,569 e 5,111 UI em C₁ e C_X, respectivamente, após 96 horas (Tabela 5). No meio contendo sulfato de amônio, não foi detectado desenvolvimento de atividades celulolíticas ao longo das 120 horas de fermentação (Tabela 6).

Tabela 7 - Parâmetros referentes a produção de celulases pela cepa EQ-55, a 37°C, no meio modificado contendo uréia e sulfato de amônio como substratos nitrogenados.

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	5,5	6,0	6,5	6,0	6,0
C ₁ (UI)	0	0	0,128	0,456	0,622	0,296
C _X (UI)	0	0	0,426	4,667	5,963	4,741
Celulose (g/100ml)	1,00				0,64	

Tabela 8 - Parâmetros referentes a produção de celulases pela cepa EQ-55, a 37°C, no meio modificado contendo uréia e peptona como substratos nitrogenados.

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	7,0	7,5	7,5	7,5	7,5
C ₁ (UI)	0	0,252	0,470	0,417	0,600	0,578
C _X (UI)	0	1,956	4,511	8,296	9,126	9,007
Celulose (g/100ml)	1,00				0,76	

Tabela 9 - Parâmetros referentes a produção de celulases pela cepa EQ-55, a 37°C, no meio modificado contendo sulfato de amônio e peptona como substratos nitrogenados.

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	5,2	5,0	5,0	5,0	5,0
C ₁ (UI)	0	0,281	0,259	0,296	0,333	0,272
C _X (UI)	0	2,111	4,044	6,281	6,163	4,326
Celulose (g/100ml)	1,00				0,70	

Tabela 10 - Parâmetros referentes a produção de celulases por *T. reesei* QM-9414, a 30°C, no meio modificado contendo peptona como único substrato nitrogenado.

Tempo (h) Parâmetros	0	24	48	72	96	120
pH	5,2	6,0	7,0	7,5	8,0	8,0
C ₁ (UI)	0	0,008	0,009	0,013	0,015	0,013
C _X (UI)	0	0,022	0,017	0,026	0,028	0,024
Celulose (g/100ml)	1,00				0,84	

Nos meios modificados onde foram empregadas duas fontes de nitrogênio, foram observadas as seguintes atividades celulolíticas máximas, em 96 horas de fermentação: no meio contendo sulfato de amônio e uréia, 0,622 e 5,963 UI para C₁ e C_X (Tabela 7), respectivamente; no meio contendo peptona e uréia, 0,600 UI para C₁ e 9,126 UI para C_X (Tabela 8); e finalmente, no meio contendo sulfato de amônio e peptona, 0,333 e 6,163 UI para C₁ e C_X (Tabela 9), respectivamente.

Das três fontes de nitrogênio que compõem o meio base (4), peptona é a melhor, podendo ser retirados uréia e sulfato de amônio para a cepa EQ-55.

Os testes realizados com *T. reesei* QM-9414, a 30°C, no meio modificado contendo peptona como único substrato nitrogenado e sem tamponamento, mostraram que este meio não ofereceu condições adequadas ao bom desenvolvimento de atividades celulolíticas (Tabela 10) embora tenha sido o mais indicado para a cepa EQ-55 (Tabela 4).

A atividade em exo-glucanase (C₁) da cepa EQ-55, a 37°C, no meio modificado contendo peptona como única fonte de nitrogênio, foi cerca de duas vezes maior do que no meio base (4) (Tabelas 1 e 4) e aproximadamente doze vezes maior do que a da cepa *T. reesei* QM-9414 a 30°C, também no meio base (4) (Tabela 2).

Agradecimentos

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisas (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e do Conselho de Pesquisas e Ensino de Graduação da U.F.R.J. (CPEG).

Referências Bibliográficas

1. American Type Culture Collection - Catalogue of strains I. 15th ed. Rockville, Maryland, ATCC, 1982.

2. Bellamy, W.D. - Cellulose as source of single cell protein - A preliminary evaluation - General Electric Report, 69-C-335, 1969.
3. Coutts, A.D. & Smith, R.E. - Factor influencing the production of cellulases by *Sporotrichum thermophile*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 31:819-825, 1976.
4. Mandels, M. & Reese, E.T. - Induction of cellulase in *Trichoderma viride* as influenced by carbon sources and metals. *J. Bacteriol.*, 73:269-278, 1957.
5. Mandels, M.; Hontz, L. & Nystrom, J. - Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *Biotechn. Bioeng.*, 16:1471-1493, 1974.
6. Menezes, H.C.; Menezes, T.J.B. & Villas-Boas, H.Jr. - Fungal cultures and culture mediums for the production of cellulase. *Biotechn. Bioeng.*, 15:1123-1129, 1979.
7. Miller, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31:426, 1959.
8. Moo-Young, M.; Chahal, D.S.; Swan, J.E. & Robinson, C.W. - SCP production by *Chaetomium cellulolyticum*: a new thermotolerant cellulolytic fungus. *Biotechn. Bioeng.*, 19:527-538, 1977.
9. Silveira, M.M. - Atividade celulolítica de bolores de solo brasileiro isolados a 45°C. Rio de Janeiro, Escola de Química, UFRJ, 1983 (Tese de Mestrado).
10. Updegraff, D.M. - Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Anal. Biochem.*, 32:420-424, 1969.

ASPECTOS DA MICROBIOTA FÚNGICA DO SOLO DE CULTURA DE MILHO (*ZEA MAYS*), TRATADO COM VINHAÇA, NO MUNICÍPIO DE RIO CLARO, SP*

Sânia Maria Tauk

Deptº de Ecologia

Instituto de Biociências, UNESP
Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

Recebido para publicação em 17/06/87

Resumo

Foi estudado Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, com cultura de milho, sob três tratamentos: vinhaça; adubo mineral e testemunha. O número de microrganismos foi determinado pelo método indireto, com a técnica de diluição em série e meio de Martin com estreptomicina. As placas foram incubadas por 72 horas a 28°C. A vinhaça e o adubo mineral não acarretaram mudanças do número de colônias fúngicas, em relação ao solo testemunha. Entretanto houve variações quanto ao grupo de fungos encontrado. A densidade de leveduras diminuiu com adição do resíduo. Os fungos com maior densidade foram: leveduras; *Penicillium*; *Trichoderma*; *Verticillium*; *Mucor*; *Aspergillus*; *Fusarium* e *Chaetomium*.

Summary

*Aspects of fungal microflora in corn (*Zea mays*) crop soil treated with vinasse in Rio Claro, State of São Paulo, Brazil*

A corn crop area in Red-Yellow Latosol, sand phase, was studied under three treatments; vinasse addition; mineral fertilizer and control. The number of microorganisms was determined by the indirect method using serial dilution plate method and Martin culture medium with streptomycin. The plates were incubated at 28°C for 72 hours. The vinasse addition and the mineral fertilizer did not change the number of fungus communities in relation to soil control, although variations occurred in the groups of fungi. The density of yeast community decreased after vinasse addition. The most frequent fungi found were: yeasts; *Penicillium*; *Trichoderma*; *Verticillium*; *Mucor*; *Aspergillus*; *Fusarium* and *Chaetomium*.

Introdução

A vinhaça, efluente das usinas de produção do açúcar e álcool, vem sendo utilizada como fertilizante da cultura de cana-de-açúcar. Entretanto torna-se necessária a complementação mineral, principalmente com nitrogênio e fósforo, para obtenção de resultados mais vantajosos (7).

Foi verificado anteriormente que em solo arenoso, doses crescentes de vinhaça acarretaram redução na germinação de milho. Efeitos benéficos da aplicação da vinhaça, entretanto, têm sido citados para cultura de cana-de-açúcar, porém com ênfase nos aspectos químicos e físicos do solo (6).

* Financiado pela FINEP

Estudos sobre a microbiota do solo tratado com vinhaça verificaram aumento da quantidade de microrganismos, havendo predominância, entre os fungos, dos gêneros *Neurospora*, *Aspergillus*, *Penicillium* e *Mucor* (1, 5).

Embora não se renegue aqui a importância da visão agrícola que enfatiza a produtividade, coloca-se a premência de reconhecer o solo como um sistema que contém atividade própria, que possibilita a ciclagem de nutrientes, mantendo consequentemente, sua fertilidade, na qual os microrganismos são indispensáveis.

Assim na cultura de milho utilizada para estudos sobre o efeito da vinhaça, foram verificados vários parâmetros, dentre eles a determinação da densidade de alguns grupos de microrganismos, com o objetivo de se entender melhor a ação desse resíduo na dinâmica do solo.

Material e Métodos

Em uma área da Fazenda São José, Município de Rio Claro, SP, onde a cana-de-açúcar substituiu o cerrado há quatro anos atrás, após a retirada dessa cultura, o solo foi preparado para o plantio de milho, utilizando-se três tratamentos: vinhaça, 80 m³/ha; adubo mineral-fórmula 5-30-20, 250 Kg/ha e testemunha. Estes tratamentos foram utilizados uma única vez e as parcelas correspondentes, no total de 12, foram distribuídas ao acaso, na área de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa.

Nestas parcelas não foram colocados herbicidas ou inseticidas ou ainda qualquer outro defensivo agrícola recomendado para cultura de milho. Porém na cultura anteriormente implantada foram utilizados aditivos durante os quatro anos de permanência da mesma. Utilizou-se vinhaça do tipo de caldo misto, adicionada a quente por toda a extensão das parcelas enquanto o adubo mineral foi colocado somente nas soqueiras.

As coletas foram realizadas em diferentes épocas, tendo sido a primeira um dia após a retirada da cana-de-açúcar, em novembro de 1985. O plantio do milho foi realizado após um mês e quando a cultura se encontrava com 40, 70, 90 e 110 dias de idade, novamente foram coletadas amostras compostas do solo, até 15cm de profundidade, das linhas e das entre-linhas da cultura. O solo foi colocado em sacos plásticos, devidamente etiquetados e levados para o laboratório, onde as amostras foram passadas em peneira com malha de 2,83mm e homogeneizadas individualmente para o processamento imediato.

A densidade de microrganismos do solo foi determinada utilizando-se o método indireto, com a técnica de diluição em série (4), a partir de uma suspensão de 10g de solo em 90ml de solução salina previamente esterilizada. O meio de cultura utilizado foi o de Martin com estreptomicina (10), escolhido após vários testes preliminares, por fornecer melhor crescimento de fungos telúricos.

As placas foram incubadas a 28°C durante 72 horas, após as quais as colônias foram contadas.

Os fungos foram identificados utilizando-se lâminas montadas em condições assépticas e observadas em microscópio. Quando necessário utilizou-se corante azul de Aman para evidenciação das frutificações e o meio de batata-dextrose-agar (9) para induzir a produção de esporos pelos fungos. Estes foram identificados utilizando-se chaves de identificação (2, 3).

A análise estatística foi realizada com o teste de variância com dois fatores e com réplicas e com teste do limite da menor diferença (11).

Resultados e Discussão

A densidade de fungos no solo antes da instalação da cultura de milho foi 10⁷, Figura 1. Quando essa cultura encontrou-se com 40 dias de idade, estes valores foram menores para os três tratamentos. Entretanto, observou-se que durante todo o período de estudo, não houve diferença estatisticamente significativa para o número de colônias encontradas nas placas, em relação ao solo coletado nas parcelas com diferentes tratamentos, Figura 1. Isto demonstrou que tanto a vinhaça como o adubo mineral não acarretaram alterações na densidade de fungos do solo, nas condições

específicas dos experimentos estudados.

Foi constatado que as diferenças ocorreram quanto aos períodos de coletas, demonstrando que o número de fungos telúricos variou com a idade da cultura, porém não houve diferença em relação aos tratamentos usados e nem quanto as linhas e entre-linhas da cultura, não ocorrendo interação dos fatores utilizados.

As colônias foram individualmente identificadas para verificar se a vinhaça, mesmo não acarretando alterações quantitativas, não poderia alterar a diversidade dos fungos. Antes do plantio do milho, os grupos mais abundantes foram leveduras, Figura 7, e o gênero *Verticillium*, Figura 6, sendo encontrados ainda *Penicillium*, Figura 9, *Aspergillus*, Figura 5, *Mucor*, Figura 3 e *Chaetomium*, Figura 4.

No solo da cultura de milho com 40 dias idade estes mesmos fungos foram observados, havendo predominância de *Verticillium*, principalmente com adição de vinhaça ou adubo mineral. Aos 70 dias, isto é, em fevereiro, observou-se que os grupos mais abundantes foram *Penicillium*, Figura 9 e leveduras, Figura 7, sendo que a adição da vinhaça favoreceu o aumento do primeiro, ao contrário para as últimas, houve decréscimo da densidade em relação ao solo testemunha e aquele tratado com adubo mineral. A partir desse período foi observado o gênero *Fusarium*, no solo com diferentes tratamentos, Figura 8.

Figura 1 - Número de colônias de fungos, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa das linhas (◻) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.

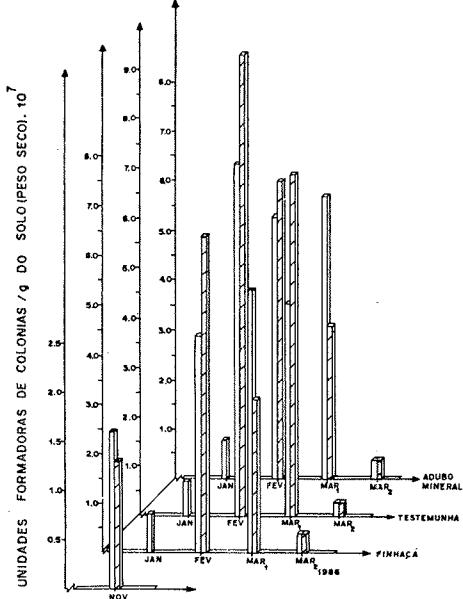


Figura 2 - Número de colônias de *Trichoderma*, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (◻) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.

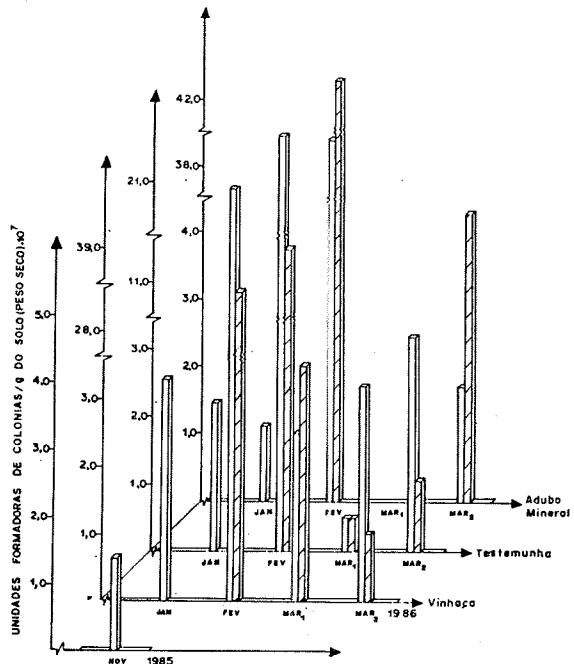


Figura 3 – Número de colônias de *Mucor*, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (◻) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.

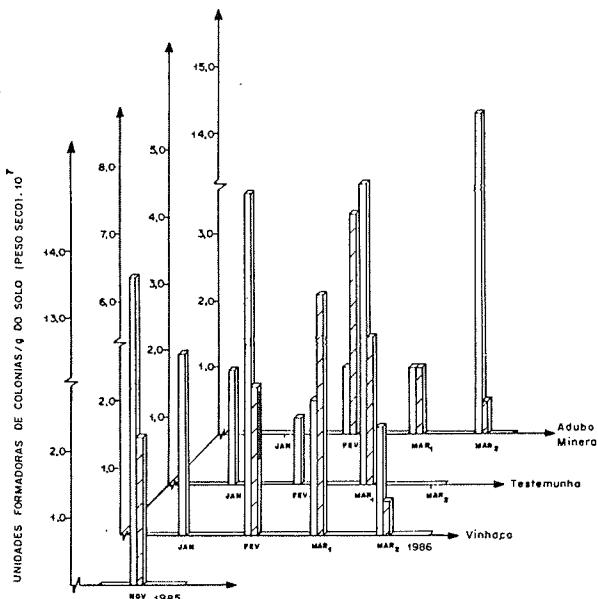


Figura 4 – Número de colônias de *Chaetomium*, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (◻) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.

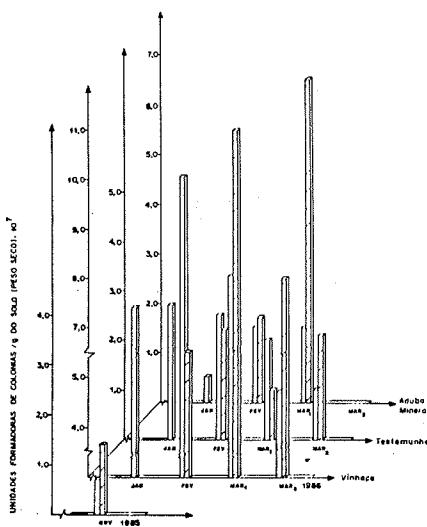


Figura 5 - Número de colônias de *Aspergillus*, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (◻) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.

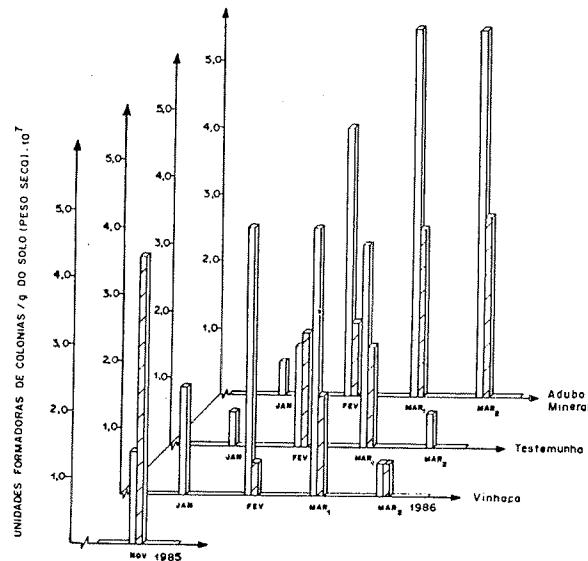


Figura 6 - Número de colônias de *Verticillium*, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (◻) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.

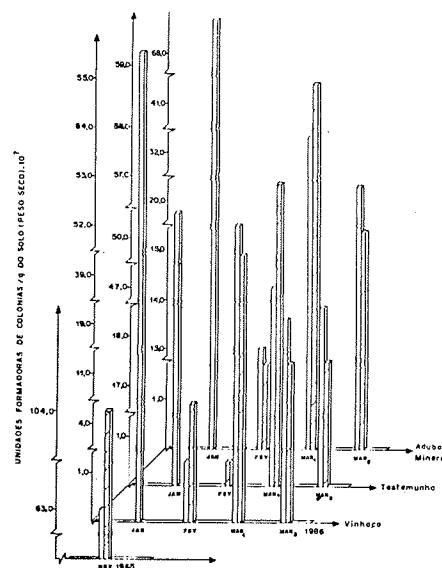


Figura 7 - Número de colônias de leveduras, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (■) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.

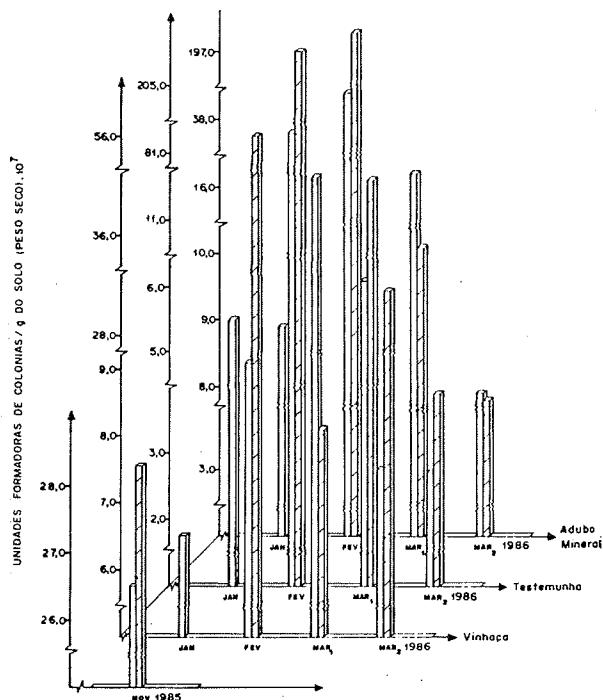
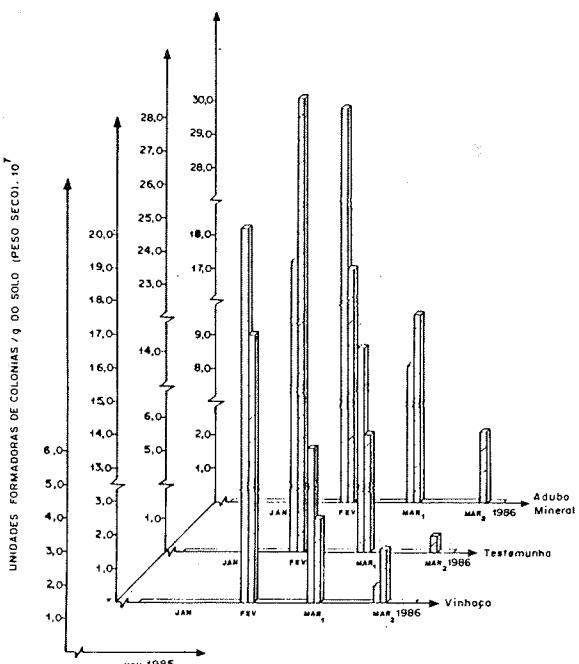


Figura 8 - Número de colônias de *Fusarium*, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (■) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.



A adição de adubo mineral demonstrou tendência em aumentar a densidade dos gêneros *Fusarium* e *Aspergillus*, em relação aos demais tratamentos, enquanto que a vinhaça foi favorável para acarretar acréscimo dos demais grupos, exceptuando-se as leveduras e o gênero *Fusarium*. Entretanto, esses resultados foram diferentes dependendo do período no qual a amostra de solo foi coletada.

O gênero *Trichoderma*, em janeiro, apresentou-se com maior densidade no solo tratado com vinhaça, porém maior número desse microrganismo foi observado em fevereiro/1986, Figura 3.

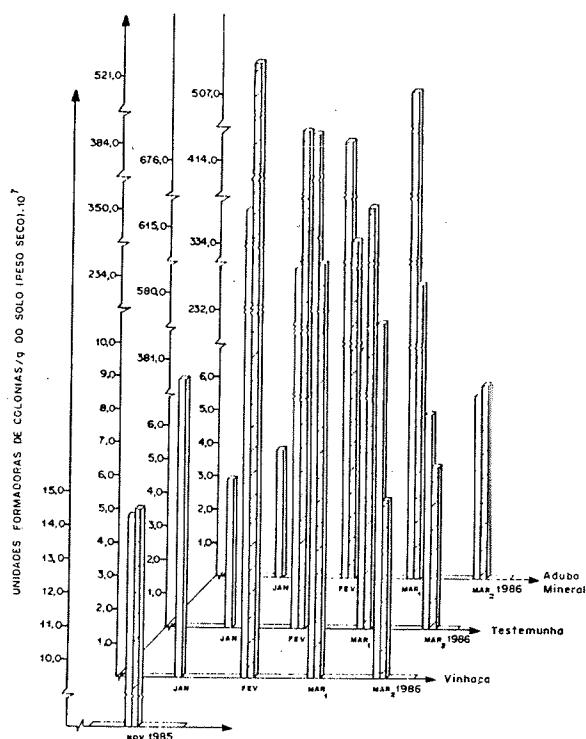
Os fungos acima citados foram também encontrados no solo sob cerrado, utilizando-se a mesma metodologia aqui empregada para isolamento (Tauk, S.M. - n.p.) ou com a utilização de outros tipos de meios de cultura (12). Esses fungos foram encontrados em solo sob cerrado de outras regiões (5, 8) e naquele cultivado com cana-de-açúcar (1).

Assim, embora a vinhaça não tenha aumentado o número total de colônias de fungos observadas em placas de Petri, a mesma acarretou mudanças na densidade dos grupos desses microrganismos, aumentando ou diminuindo seus números no solo sob cultura de milho. A densidade das leveduras diminuiu com a adição de vinhaça semelhantemente ao constatado em solo sob cerrado (Tauk, S.M. - n.p.).

A presença da cobertura vegetal parece não ter contribuído para a variação do número de fungos do solo. Entretanto em fevereiro/1986 observou-se maior densidade da microbiota fúngica, quando constatou-se também maiores teores de matéria orgânica, cálcio, fósforo, carbono orgânico e nitrogênio total no solo (Tauk, S.M. - n.p.), portanto estes parâmetros devem ter contribuído para obtenção de maior número da microbiota fúngica, nesse período.

A vinhaça, na dose utilizada parece não interferir significativamente no solo do ecossistema em estudo, com relação à microbiota fúngica, mantendo inalteradas as atividades relacionadas com a ciclagem de nutrientes.

Figura 9 - Número de colônias de *Penicillium*, até 15cm de profundidade, de Latossolo Vermelho-Amarelo, fase arenosa, das linhas (■) e das entre-linhas (▨) da cultura de milho.



Referências Bibliográficas

1. Almeida, F.P. - Interferência dos fungos na adubação do solo pela vinhaça. Bol. Inst. Zimotécn. ESALQ, Piracicaba, 5:1-9, 1953.
2. Barnett, H.L. & Hunter, B.B. - Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis, Burgess Publ., 1972.
3. Barron, G.L. - The genera of Hyphomycetes from soil. New York, Robert E. Krieger, 1972.

- 4.Clark, F.E. - Agar-plate method for total microbial count. In: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. Madison, American Society of Agronomy, 1965, p.1460-1466
- 5.Costa, S.M.G. da - Efeito da adição da vinhaça na microflora do solo de cerrado, da região de Corumbataí, SP. Rio Claro, UNESP, 1983 (Dissertação de Mestrado).
- 6.Glória, N.A. da - Utilização agrícola da vinhaça. Brasil Açuc., 86:397-403, 1975.
- 7.Gomes, P. - Adubos e Adubações. São Paulo, Nobel, 1984.
- 8.Grandi, R.P. - Hifomicetos de solo no cerrado da reserva biológica de Mogi-Guaçú (São Paulo-Brasil) e triagem da ação amilolítica, celulolítica e proteolítica. São Paulo, Esc. Paulista de Medicina, 1984. (Dissertação de Mestrado).
- 9.Lacaz, C. da S. - Micologia médica. 5^a ed., São Paulo, Savier, 1973.
- 10.Larpent, J.P. & Larpent-Courgaud, M. - Microbiologia prática. São Paulo, Ed. Edgard Blücher, 1975.
- 11.Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. - Biometry. San Francisco, W.H. Freeman, 1969.
- 12.Tauk, S.M. & Ruegger, M.S. - Alguns aspectos da microbiota do solo sob vegetação de cerrado, tratado com vinhaça, no município de Corumbataí, SP. Rev. Microbiol., São Paulo, 8:67-76.

OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM POPULAÇÃO URBANA: AMOSTRAGEM DE UM LABORATÓRIO PRIVADO EM PORTO ALEGRE, RS

Adelina Mezzari
Paulo Fausto Cauduro
& Cícero Armídio Gomes Dias

Recebido para publicação em 27/08/87

Laboratório Weinmann
Rua Ramiro Barcelos, 910 - 5º Andar
90210 Porto Alegre RS, Brasil

Resumo

Foi verificada a ocorrência de fungos em 332 amostras de diversos materiais clínicos recebidos no laboratório durante o espaço de um ano. São citadas as espécies identificadas e a rotina de isolamento. Os dermatófitos, notadamente *Trichophyton rubrum*, foram os fungos mais frequentemente observados. Foram obtidas quatro amostras positivas para *Cryptococcus neoformans*, a partir de noventa e três amostras de líquido céfalo raquídeo examinadas. *Candida albicans* e *Malassezia furfur* foram também proporcionalmente frequentes.

Summary

Incidence of fungi in urban population. Data of a private laboratory in Porto Alegre, RS

The presence of fungi in 332 samples of various clinical materials in the space of an year was verified. The identified species and the routine of isolation are cited. The dermatophytes were the fungi more frequently observed, mainly *Trichophyton rubrum*. Four samples in ninety three cerebrospinal fluid specimens, were positive for *Cryptococcus neoformans*. *Malassezia furfur* and *Candida albicans* were also proportionaly frequents.

Introdução

Com o intuito de avaliar a microbiota fúngica presente em nosso meio, pesquisou-se 332 amostras de pacientes que residem em zona urbana e possuem boas condições sócio econômicas, durante o período de um ano (maio de 1986 a maio de 1987). A pesquisa, obedecendo critério de solicitação médica, foi efetivada mediante exame direto complementado ou não por cultura. Verificou-se ainda a frequência dos fungos em relação ao sexo dos pacientes, porém não foi estudada a ocorrência relacionada à variação sazonal. Não foram documentados hábitos de higiene e atividade dos pacientes, bem como a terapia eventualmente utilizada.

Como a sistemática e taxonomia fúngicas são ainda incompletas (4), trabalhou-se com as micoses de interesse médico e distribuiu-se os fungos encontrados como agentes de micoses de pele, pelos e unhas e de materiais não provenientes destas lesões.

Materiais e Métodos

1. Colheita: O material foi colhido fazendo-se assepsia, em regiões descamativas, Rev. Microbiol., São Paulo, 19(3):290-292, Jul./Set. 1988.

com éter sulfúrico ou álcool. Em casos de lesões abertas, as mesmas foram previamente limpas com salina esterilizada. Quando o material era produto de descamação, fragmento de unha ou pelo, manteve-se a amostra entre duas lâminas, envoltas em papel, por 48 horas. Quanto aos demais materiais (líquido céfalo raquidiano, urina, e lesões ganglionares) obedeceu-se critérios já consagrados por diversos autores (3, 4, 5, 11).

2. Exame direto: O material foi clarificado com KOH a 10% e observado ao microscópio. Em casos especiais, foram também realizadas montagens em tinta da China, lactofenol, colorações de Gram, Giemsa e Ziehl-Neelsen. Em algumas oportunidades, o diagnóstico foi feito através desta etapa, tendo-se em vista as características próprias dos elementos observados.

3. Cultura e Identificação: O material foi semeado em ágar-Sabouraud glicose (Difco) e ágar-Sabouraud glicose acrescido de cicloheximida (0,4g/litro) e cloranfenicol (0,5g/litro) e incubado a 25°C ou, quando necessário, a 37°C, durante no mínimo 15 dias. A identificação foi realizada através da observação macro e microscópica das colônias, empregando-se para a esporulação dos fungos, o ágar "Lactrimel" (Londero, A.T. - comunicação pessoal). Quando necessário, recorreu-se à pesquisa de urease para a diferenciação de *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. *Candida albicans* foi presuntivamente identificada através da prova do tubo germinativo em soro humano (8). Embora *Candida stellatoidea* possa também formar tubo germinativo, levou-se em conta que a posição taxonômica desta levedura é incerta, havendo autores que a consideram como uma variante de *Candida albicans* não produtora de alfa glicosidase (5). *Cryptococcus neoformans* foi presuntivamente identificado pela presença de cápsula observável através de preparação com tinta da China. A identificação definitiva de leveduras de interesse médico não esteve entre os propósitos deste trabalho.

Resultados

Dentre as 332 amostras analisadas, em 44 oportunidades foi realizada apenas a pesquisa direta, obtendo-se 24 amostras positivas (54,54%) para elementos com características morfológicas sugestivas de fungos. Nas demais 288 amostras efetuou-se pesquisa direta e/ou cultura para fungos, obtendo-se 75 casos positivos (26,04%).

Quanto ao sexo dos pacientes, 167 foram do sexo feminino, com 47 casos positivos (28,14%) e 165 do sexo masculino com 52 resultados positivos (31,35%).

Entre os materiais provenientes de lesões de pele, pelos e unhas, analisou-se 211 amostras, sendo que em 58 (27,49%) delas foi constatada a presença de fungos (Tabela 1). A espécie mais frequentemente encontrada foi *Trichophyton rubrum* com 25 casos (11,85%).

Um total de 121 amostras de materiais clínicos diversos (não incluindo lesões de pele, pelos e unhas) foi enviado ao laboratório. Destas 121 amostras, 93 corresponderam a líquido céfalo raquidiano, nas quais identificou-se, presuntivamente, *Cryptococcus neoformans*, através de exame direto e/ou cultivo em 4 vezes. As demais 28 amostras originaram-se de materiais clínicos não especificados, observando-se onze casos de *Candida albicans*, um de *Aspergillus niger*, um de *Aspergillus fumigatus* e um de *Sporothrix schenckii*.

Discussão

Londero (6), observando um grande número de amostras ao longo de vinte anos, encontrou *Trichophyton rubrum* como dermatófito mais frequente no estado do Rio Grande do Sul. Os achados desta pesquisa foram ao encontro desta observação. Verificou-se também mais um caso de dermatofitose por *Trichophyton tonsurans* (9), inobstante ser este fungo raramente encontrado em nosso meio, sendo frequente em estados brasileiros situados na faixa intertropical, prevalecendo nas regiões norte e nordeste (1, 2, 10).

Somente um caso de esporotricose foi observado. Esta casuística incluiu pouquíssimas amostras de tecido subcutâneo, o que torna impossível analisar este dado, como por exemplo, o trabalho de Londero e col. (7) sobre a incidência desta infecção no Rio Grande do Sul. *Malassezia furfur* também foi um achado proporcionalmente frequente. Observou-se ainda a presença de *Cryptococcus neoformans* em quatro amostras de líquido céfalo raquidiano, o que correspondeu a 4,3% do total das amostras de ICR analisadas para a presença de fungos. Este índice é aparentemente alto, porém a falta de uma melhor caracterização da população estudada, não permitiu maiores inferências acerca disto.

Em algumas situações observou-se elementos com características morfológicas de fungos ao exame direto, sem que tenha ocorrido positividade da cultura. A eventual terapia antifúngica e/ou amostras não adequadas podem estar associadas à esta observação. Verificou-se certa paridade na incidência de micoses entre homens e mulheres, embora tenha ocorrido positividade um pouco maior para os primeiros.

Referências Bibliográficas

1. Assis, J.D. - Um caso de tinea pelo *Trichophyton flavum*. Arq. Riograndense Med., 2:2-4, 1929.
2. Bassanesi, M.C.; Annes, E. & Severo, L.C. - Microepidemia por *Trichophyton tonsurans* em internato de meninos. Rev. AMRIGS, Porto Alegre, 30:100-102, 1986.
3. Conant, F.N. & col. Manual of Clinical Mycology. 3 ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1971.
4. Lacaz, C.S. & col. - Micologia Médica. 7 ed. São Paulo: Sarvier, 1984.
5. Lennette, E.H.; Ballows, A.; Hausler Jr., W.J. & Shadomy, H.J. - Manual de Microbiologia Clínica, 4 ed. Buenos Aires, Editorial Panamericana, p. 644-678, 1987.
6. Londero, A.T. & Ramos, C.D. - A twenty-year (1960-1980) Survey of dermatophytes in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Fifth International conference on mycoses superficial, cutaneous and subcutaneous infections. Pan Amer. Health Organization, Washington, 1980.
7. Londero, A.T. & Ramos, C.D. - Esporotricose. Estudo de 195 casos observados no interior do estado do Rio Grande do Sul. Rev. AMRIGS, Porto Alegre, 24:104-106, 1980.
8. Mackenzie, D.W.R. - Serum tube identification of *Candida albicans* J. Clin. Path. 15:563-565, 1962.
9. Mezzari, A.; Cauduro, P.F. & Dias, C.A. - Relato de um caso de dermatofitose pelo *Trichophyton tonsurans* no Rio Grande do Sul. Rev. Microbiol. São Paulo, 18(4):357-359, Out/Dez., 1987.
10. Ramos, C.D.; Rojas, S.F. & Londero, A.T. - Dermatofitoses por *Trichophyton tonsurans* observados no Rio Grande do Sul. Rev. AMRIGS, Porto Alegre, 25:236-238, 1981.
11. Severo, L.C. - Colheita e transporte de espécime clínico para exame micológico. Rev. AMRIGS, Porto Alegre, 30:204-208, 1986.

Tabela 1 - Frequência de fungos em 211 amostras de pele, pelos e unhas. Amostragem de um laboratório privado de Porto Alegre.

Fungos	nº	%
<i>Trichophyton rubrum</i>	25	11,85
<i>Candida albicans</i>	11	5,21
<i>Malassezia furfur</i>	11	5,21
<i>Epidermophyton floccosum</i>	06	2,84
<i>Microsporum canis</i>	02	0,94
<i>Microsporum gypseum</i>	01	0,47
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	01	0,47
<i>Trichophyton tonsurans</i>	01	0,47
Positivos	58	27,49
Negativos	153	72,51
Total	211	100

CONTRIBUIÇÃO AO CONHECIMENTO DA COMPOSIÇÃO ANTIGÊNICA DO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS. ESTUDO DE 5 AMOSTRAS

Maria Lucia Scroferneker

Deptº de Microbiologia
Instituto de Biociências
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Recebido para publicação em 26/11/87

Celeste Fava Netto
& Ana Lucia de Oliveira Schalch
Laboratório Bio-Ciência/Lavoisier
Av. Angélica, 1832
01228 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Foram estudadas 5 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Para cada amostra do fungo foram imunizados 3 coelhos, obtendo-se 15 soros hiperimunes. Utilizando-se estes anti-soros e抗igenos filtrados e lisados, obtidos separadamente de cada amostra, processaram-se estudos imunoquímicos através das reações de dupla difusão em gel de ágar, imunoeletroforese e imunoeletrosmoforese. Foi possível demonstrar diferenças quanto às respostas dos animais imunizados com a mesma amostra do fungo. Demonstrou-se, também, que as diferentes amostras do fungo apresentavam alguns componentes antigenicos comuns da espécie e componentes próprios de cada amostra. Discute-se a importância da utilização de抗igenos complexos no estudo imunológico dos pacientes de paracoccidioidomicose.

Summary

Five *Paracoccidioides brasiliensis* strains were studied. Tree rabbits were immunized with each strain and a total of fifteen anti-sera were obtained. With these anti-sera and filtrates and lysates, prepared from each fungi strain as antigens, immunochemical studies were realized by double immunodiffusion in agar, immunoelectrophoresis and immunoelctroosmophoresis. By these studies it was possible to demonstrate that different responses were obtained in animals immunized with the same strain of the fungi. It was also demonstrated that the *P. brasiliensis* strains have some common antigenic components of the specie and others that are self of the strain. Comments are done about the utilization of complex antigens in the immunological study of paracoccidioidomycotic patients.

Introdução

As variações morfológicas, bioquímicas, metabólicas, de patogenicidade e composição antigenica que ocorrem em diferentes amostras de *P. brasiliensis* tem sido pouco estudadas (3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20).

Por outro lado, a obtenção de soros hiperimunes anti- *P. brasiliensis* não é fácil (14).

O estudo sobre a complexidade, identidade e não identidade entre os componentes antigênicos, de várias amostras de *P. brasiliensis*, utilizando soros hiperimunes, preparados para cada amostra do fungo, é a contribuição que apresentamos na presente pesquisa.

Material e Métodos

1. Animais - Amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Antígenos, filtrado e lisado. Soros hiperimunes. Preparados e parcialmente avaliados como em trabalho anterior (15).

2. Ágar Oxoid a 1% em água destilada.

3. Ágar + agarose a 1% em solução fisiológica.

Ágar (Oxoid), 0,5g; agarose (Sigma), 0,5g; azida sódica 0,02g e solução fisiológica (0,85%), 100ml.

4. Tampão veronal com acetato de sódio.

4.1. Solução mãe

Dietil-barbiturato de sódio (Merck) 9,81g; Acetato de sódio "Mallincrodt" 6,47g; Ácido clorídrico "Merck" 1,0g; Azida sódica 1,0g; Água destilada 1.000ml pH=8,6 $\mu=0,1$

4.2. Solução de uso ($\mu=0,04$)

400ml de solução mãe + 600ml de água destilada.

4.3. Solução para a cuba ($\mu=0,06$)

600ml de solução mãe + 400ml de água destilada.

5. Ágar + agarose a 1% em tampão de veronal, acetato de sódio.

6. Solução corante

Álcool metílico "Conelgo" 100ml; Ácido acético glacial "B. Herzog" 20ml; Água destilada 80ml; Amido Schwarz "10B" 1,0g.

7. Solução descorante

Álcool metílico "Conelgo" 475ml; Ácido acético glacial "B. Herzog" 50ml; Água destilada 475ml.

Estas soluções são guardadas em frasco escuro.

8. Reação de dupla difusão em gel de agar

A - Em lâminas de microscópia

Lâminas de microscópia de 25 x 75mm limpas e desengorduradas foram recobertas com ágar a 1% em água destilada. Secadas em estufa. Sobre sua face recoberta eram colocados 3ml de ágar-agarose a 1% em solução fisiológica com azida sódica.

Após solidificação do ágar-agarose foram recortados os orifícios como demonstrado na Figura 1: cinco orifícios superiores com 4mm de diâmetro destinados aos antígenos e quatro orifícios inferiores de 6mm de diâmetro destinados aos anti-soros. A distância entre orifícios superiores e inferiores igual a 7mm de bordo a bordo.

Os orifícios superiores recebiam 20 μ l de antígeno e os inferiores 40 μ l de soro. Neste modelo cada um dos 15 anti-soros era difundido contra os antígenos filtrado (E) e lisado (D) das cinco amostras do fungo.

Um segundo modelo de dupla difusão sobre lâminas de microscópia, foi utilizado, com cinco orifícios maiores na parte superior e quatro orifícios menores na parte inferior. Em cada orifício superior eram colocados os anti-soros para as cinco amostras do fungo e nos orifícios inferiores um mesmo antígeno de uma amostra. Podia-se assim avaliar as diferenças entre os imune-soros. As quantidades de antígeno e anti-soro distribuídas eram as mesmas que no modelo anterior.

As lâminas foram deixadas difundir em câmara úmida à temperatura ambiente e leituras foram realizadas após 24, 48 e 72 horas.

Em seguida as lâminas foram lavadas por 5 dias em solução fisiológica, secadas coradas durante 10 minutos, descoradas e secadas novamente. Foram obtidas, assim 60 lâminas, 30 para cada exame de cada imune-soro contra os抗ígenos filtrado e lisado de cada amostra e 30 para a análise de cada抗ígeno filtrado e lisado contra os imune-soros.

B - Em lâminas de vidro de 75 x 100mm (Segundo Mackenzie & Cols., (7)). Sobre estas lâminas limpas e desengorduradas eram colocados 5ml de ágar a 1% em água destilada. Em seguida eram secadas em estufa. Sobre a superfície assim recoberta eram distribuídos 16ml de ágar-agarose a 1% em solução fisiológica (NaCl a 0,85% com azida sódica a 1/1000). Após completa solidificação da camada de ágar-agarose eram praticados os orifícios como demonstrado na Figura 2. Cada lâmina permitia dois modelos com orifício central de 6mm e 5 periféricos de 4mm de diâmetro. A distância entre o orifício central e os periféricos era de 12mm bordo a bordo.

O orifício central recebia 40 μ l de soro e os periféricos 20 μ l de抗ígeno. Os orifícios foram preenchidos por 3 vezes perfazendo 120 μ l de soro e 60 μ l de抗ígeno.

O orifício central recebia o mesmo anti-soro à E e à D e os periféricos抗ígenos filtrados à E e lisados à D das cinco amostras de *P. brasiliensis* 2, 18, 192, 265 e SN iniciando-se pelo orifício superior e seguindo-se no sentido dos ponteiros do relógio, respectivamente.

O processamento da reação até a obtenção da lâmina corada foi o mesmo que no item anterior sendo que as lâminas foram mantidas na câmara úmida por 120hs e leituras foram feitas às 24, 48, 72 e 120hs.

A Figura 5 mostra modelo semelhante de imunodifusão. O orifício central de 6mm e periféricos de 4mm. Distância entre o central e os periféricos de 8mm. Um antisoro nos orifícios centrais e o抗ígeno homólogo nos orifícios 1, 3, 5, 8 e 9 da E para a D, obedecendo-se o sentido do movimento do ponteiro de um relógio e iniciando-se a contagem pelo orifício superior a E.

Os orifícios 2, 4, 6 e 7 recebiam os抗ígenos das amostras heterologas.

Com o primeiro modelo foram examinados todos os 15 anti-soros contra os抗ígenos filtrado e lisado de cada amostra num total de 15 lâminas e um anti-soro de cada amostra contra seus próprios抗ígenos, total de 5 lâminas.

Com a distribuição intercalada de抗ígenos homólogos e heterólogos foram feitas 10 lâminas; cinco para os抗ígenos filtrados e cinco para os抗ígenos lisados de cada amostra contra um anti-soro de um dos três coelhos imunizados para cada amostra.

9. Imunoelétroforese (Grabar & Williams)

Utilizou-se a metodologia aconselhada por Yarzabal & Cols., (18) com pequenas modificações.

Lâminas de vidro de 75 x 100mm limpas e desengorduradas recobertas de ágar em água destilada como descrito anteriormente. Após secagem, recebiam 16ml de ágar-agarose a 1% em tampão de veronal com azida sódica a 1/1000. Após a solidificação do agar-agarose, sobre este gel eram praticados os orifícios e as canaletas conforme demonstrado na Figura 6. Os orifícios com 4mm de diâmetro, as canaletas com 2mm de largura e 75mm de comprimento. Distância dos orifícios às canaletas de 6mm bordo a bordo.

Os orifícios recebiam 20 μ l de soro repetindo-se o preenchimento por 3 vezes num total de 60 μ l.

A corrida eletroforética era de 4 horas e 30 minutos empregando-se 15mA por lâmina. Após a corrida eletroforética as canaletas recebiam 120 μ l de soro. A difusão era processada em câmara úmida à temperatura ambiente por 5 dias.

Leituras eram realizadas às 24, 48 e 72 horas. Em seguida eram acrescentados mais 120 μ l de soro nas canaletas e a incubação prosseguia por mais 48 horas.

Em seguida as lâminas eram lavadas, secadas e coradas como já descrito. Todos os 15 imune-soros foram examinados pela imunoelétroforese com抗ígenos filtrados e lisados homólogos.

10. Imunoeletroosmoforese (Conti-Dias & Cols., [1]).

Foram utilizadas lâminas de 75 x 100mm preparadas como descrito na imunoeletroforese.

Sobre a camada de ágar-agarose foram praticados orifícios centrais com 4mm de diâmetro que recebiam 20 μ l de antígenos. Os orifícios inferiores de 6mm de diâmetro situados próximos ao polo positivo recebiam 40 μ l de soro.

Após a corrida eletroforética de 1 hora os orifícios superiores de 6mm de diâmetro recebiam 40 μ l do anti-soro correspondente e a imundifusão era deixada processar-se por 72 horas em câmara úmida à temperatura ambiente.

Em seguida as lâminas eram lavadas, coradas e descoradas como descrito.

O modelo utilizado pode ser visto na Figura 8.

Todos os 15 imuno-soros foram experimentados na imunoeletroosmoforese frente aos antígenos filtrados e lisados homólogos.

Resultados

Não seria muito útil a apresentação de todos os resultados da imundifusão dupla, obtidos sobre 60 lâminas de microscópia. Foram apresentados na tese de doutorado de Scroferneker (14).

A Figura 1 exemplifica os resultados obtidos com a imundifusão dupla sobre lâminas de microscópia. São os resultados obtidos com os soros dos três coelhos imunizados com a amostra 192 de *P. brasiliensis* A, B e C. Nos orifícios menores os antígenos filtrados à E e lisados à D das cinco amostras 2, 18, 192, 265 e SN do fungo da E para a D, em cada lâmina. Verifica-se que houve homogeneidade de respostas nos três coelhos inoculados com a amostra 192. Um máximo de três linhas de precipitação foram obtidas com os antígenos homólogos e heterólogos. É possível verificar reações de identidade, identidade parcial e não identidade entre as amostras do fungo. Nas lâminas com o antígeno filtrado e com antígeno lisado verificam-se faixas de precipitação intensas que correspondem ao antígeno próprio da amostra.

Nas outras lâminas obtidas com o mesmo modelo de precipitação importa assinalar que para os coelhos imunizados com a amostra 2 de *P. brasiliensis* as reações de precipitação foram mais nítidas frente aos antígenos filtrados da mesma amostra sendo verificadas um máximo de 5 faixas de precipitação. Para as outras amostras do fungo as reações foram mais nítidas contra os antígenos lisados.

O mesmo sucedeu com a amostra SN, sendo que as várias faixas de componentes antigênicos próprios da amostra, foram evidenciadas com os antígenos filtrados e lisados com os soros de 2 coelhos.

Quando se utilizou o modelo de imundifusão em lâminas de microscópia, em que os 15 antisoros foram utilizados contra antígenos filtrados e antígenos lisados de cada amostra foi possível demonstrar que havia reações de identidade, de identidade parcial e de componentes antigênicos próprios de cada amostra.

Um dos antisoros contra a amostra SN revelou até 7 faixas de precipitação contra o antígeno lisado homólogo. Um dos coelhos imunizados com a amostra 18 não revelou em seu antílogo qualquer faixa de precipitação contra os antígenos filtrados das cinco amostras do fungo.

Um dos coelhos imunizados com a amostra SN revelou, no anti-soro obtido, 6 faixas de precipitação para componentes antigênicos próprios da amostra.

Quando se utilizou o segundo modelo de imundifusão dupla sobre lâminas de microscópia, em que os 15 antisoros foram difundidos contra os antígenos filtrados e lisados de cada amostra do fungo, os resultados de imundifusão dupla foram semelhantes àqueles obtidos com o primeiro modelo. Verificaram-se com maior facilidade as reações de identidade dos componentes antigênicos próprios da espécie, o maior número de faixas de precipitação quando os anti-soros reagiam com os antígenos homólogos e ainda maior número de faixas de precipitação quando os anti-soros reagiam com os antígenos lisados do que com os filtrados. A amostra SN foi a que revelou maior complexidade antigênica com 7 faixas de precipitação com o antígeno lisado. Houve também diferenças quanto aos anti-soros obtidos nos 3 coelhos imunizados com a mesma amostra.

Figura 1 - Reação de imunodifusão dupla. Lâminas A, B e C com os anti-soros dos 3 animais imunizados com a amostra 192. A E contra os抗igenos filtrados e à D contra os抗igenos lisados das amostras 2, 18, 192, 265 e SN de *P. brasiliensis*. Os soros nos orifícios inferiores e os抗igenos nos superiores.

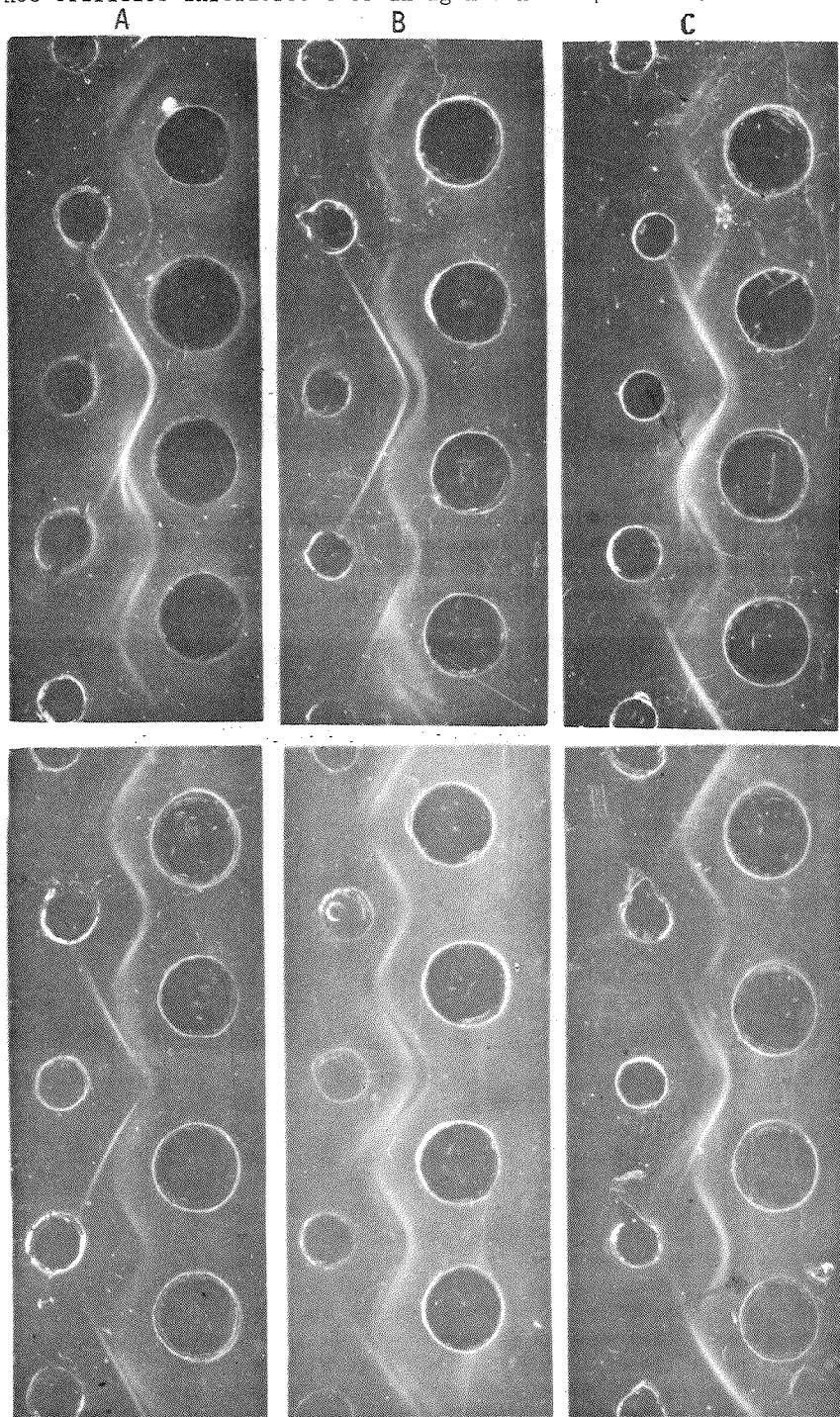


Figura 2 - Reação de imundifusão dupla. No orifício central anti-soro de um animal imunizado com a amostra 18 de *P. brasiliensis*. Nos orifícios periféricos os antígenos filtrados à E e lisados à D. Iniciando-se pelo orifício superior, no sentido dos ponteiros do relógio, os antígenos das amostras 2, 18, 192, 265 e SN.

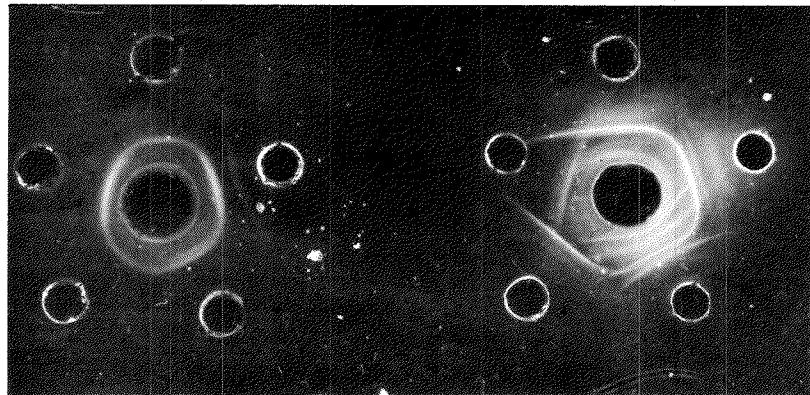


Figura 3 - Reação de imundifusão dupla. Orifício central com imune-soro de animal imunizado com a amostra SN e orifícios periféricos todos preenchidos com antígenos da mesma amostra; antígenos filtrados à E e lisados à D.

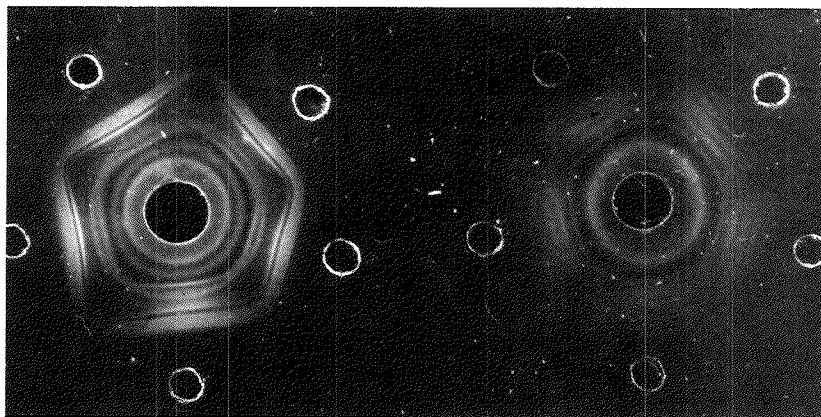


Figura 4 - Reação de imunodifusão dupla. Nos orifícios centrais um anti-soro de animal imunizado com a amostra SN. Nos orifícios periféricos抗ígenos filtrados à E e lisados à D. No orifício superior os da amostra 2 e em seguida aqueles das amostras 18, 192, 265 e SN no sentido dos ponteiros do relógio.

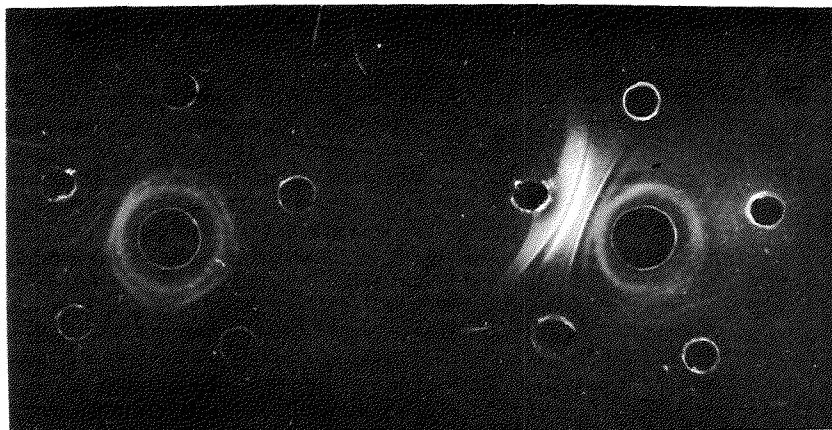


Figura 5 - Reação de imunodifusão dupla. No orifício central imune-soro contra amostra SN. Nos orifícios periféricos抗ígenos lisados da mesma amostra nos orifícios 1, 3, 5, 7 e 9 e抗ígenos das amostras 2, 18, 192 e 265 nos orifícios 2, 4, 6 e 8, contando-se da E para a D e no sentido dos ponteiros do relógio.

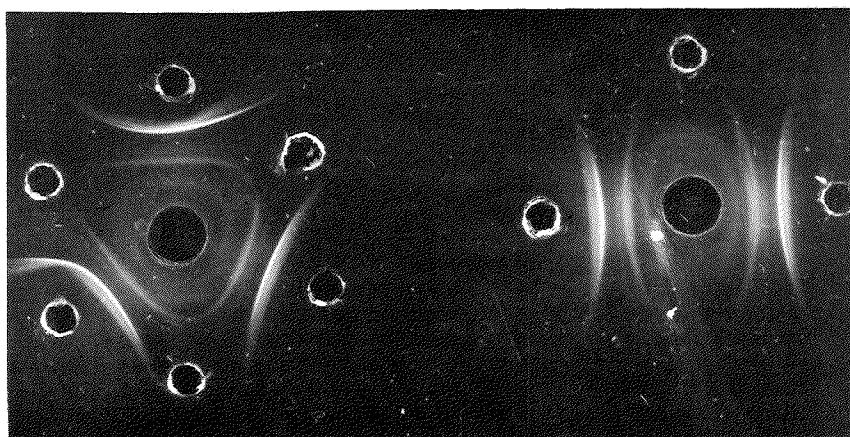


Figura 6 - Imunoelétroforese. Antígeno lisado da amostra 192. Anticorpos nas canaletas, dos 3 animais imunizados com a mesma amostra.

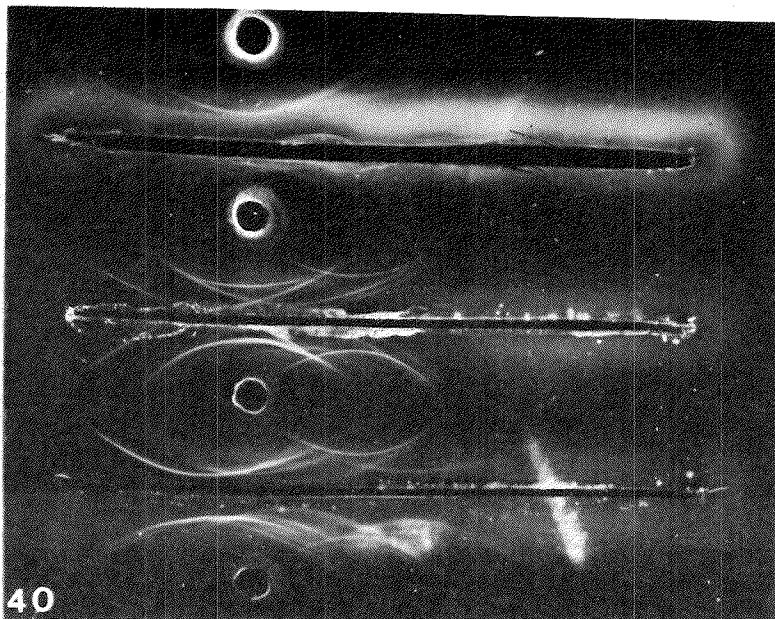


Figura 7 - Imunoelétroforese. Antígeno lisado da amostra SN. Nas canaletas, soros dos 3 animais imunizados com a mesma amostra.

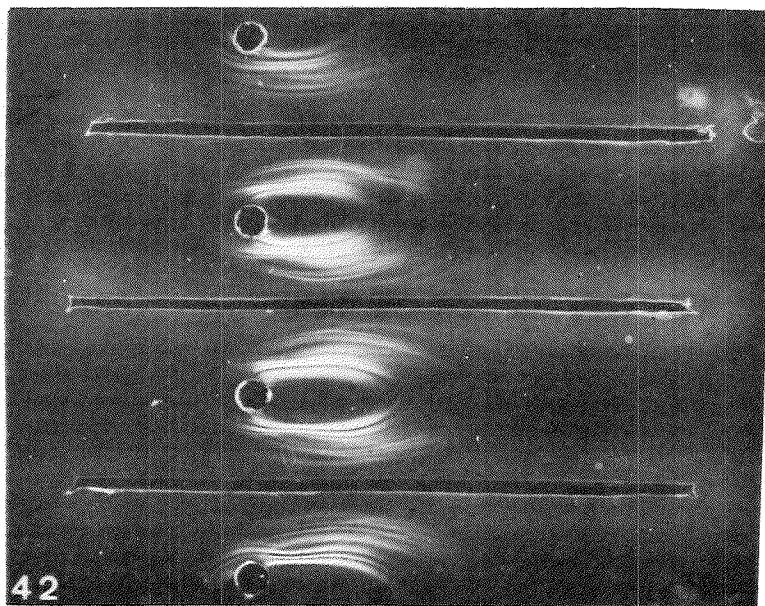
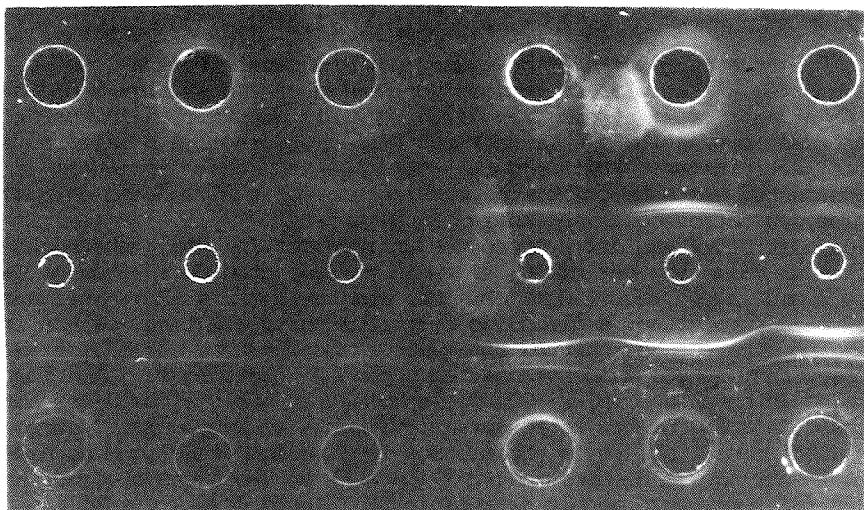


Figura 8 - Imunoelétricoosmoforese. Antígenos filtrados à E e lisados à D da amostra SN nos orifícios centrais e anti-soros obtidos dos 3 animais imunizados com a mesma amostra nos orifícios maiores inferiores e superiores.



A Figura 2 exemplifica os resultados obtidos com a imundifusão dupla realizada sobre lâminas de 75 x 100mm. Nesta lâmina o anti-soro de um coelho imunizado com a amostra 18 do *P. brasiliensis*, reagindo contra os抗ígenos filtrados (lado E) de todas as amostras revela essencialmente as faixas de precipitação de componentes抗igênicos comuns da espécie e mais uma faixa de componente抗igênico da própria amostra.

No lado D da lâmina, este anti-soro além de revelar as reações de identidade, com os componentes抗igênicos das amostras 2, 18, 192 e 265, demonstrada 3 faixas de precipitação de componentes próprios da amostra 192, 2 faixas de componentes próprios da amostra 18 e 1 faixa de componente próprio da amostra SN. Chama a atenção a falta de anticorpos neste soro que reagem com os outros componentes抗igênicos da amostra SN.

O número de componentes抗igênicos da amostra SN, revelados neste modelo de imundifusão dupla, pode ser verificado nas Figuras 3 e 4. Na Figura 3 à D, quando o antisoro reage com o抗ígeno lisado homólogo, podem ser vistas até 7 faixas de precipitação. Na Figura 4 quando o anti-soro SN reage com os抗ígenos homólogos e heterólogos. Nesta figura se demonstra à E como os抗ígenos filtrados só apresentam os componentes próprios da espécie, enquanto que, à D se demonstra a complexidade dos componentes抗igênicos do lisado da amostra SN.

Com este modelo de imundifusão dupla, o aspecto demonstrado na Figura 4, de que os抗ígenos filtrados demonstraram essencialmente os componentes próprios da espécie, enquanto que, os抗ígenos lisados, mais complexos, demonstraram, a mais, os componentes próprios da amostra, foi verificado com anti-soros das amostras 2, 192 e 265, repetindo-se a falta de anticorpos para reagir com múltiplos componentes da amostra SN.

A Figura 5 exemplifica os resultados obtidos com o mesmo modelo circular de imundifusão, mas utilizando-se os dois moldes da lâmina para 1 tipo de anti-soro. Nesta figura, os 2 orifícios centrais receberam o anti-soro da amostra SN e os orifícios periféricos os抗ígenos lisados SN nos orifícios 1, 3, 5, 7 e 9 e alternadamente os das amostras 2, 18, 192 e 265 nos orifícios 2, 4, 6 e 8. Verificou-se que neste modelo, idealizado para demonstrar as reações de identidade e não identidade dos componentes抗igênicos das amostras, o que se obteve foi, essencialmente, o seguinte: os componentes próprios da espécie, no máximo 3, foram

revelados por todos os anti-soros utilizados: um anti-soro da amostra 2 revelou maior número de componentes antigênicos homólogos quando reagia com o antígeno filtrado do que com o lisado: todos os anti-soros demonstraram maior ou menor número de componentes próprios da amostra.

Imunoeletroforese

A Figura 6 mostra os resultados obtidos na imunoeletroforese com o antígeno lisado, submetido à eletroforese e difundido contra os imune-soros obtidos nos três coelhos imunizados com a amostra 192. Como era esperado, a imunoeletroforese, quando praticada com antígeno e imune-soros homólogos, revelou o maior número de 8 componentes antigênicos. Pela figura, verifica-se que o anti-soro da canaleta superior demonstra que este coelho foi mau respondedor ao imunógeno da amostra 192, enquanto que, os outros dois responderam igualmente.

A corrida eletroforética dos componentes antigênicos foi boa, obtendo-se faixas de precipitação muito bem definidas, situadas no lado anódico e catódico da lâmina.

A Figura 7 mostra os resultados obtidos com a amostra SN: antígeno lisado submetido à eletroforese e difundido contra os soros dos três coelhos imunizados com a mesma amostra. Os componentes antigênicos não migraram satisfatoriamente pela eletroforese não sendo evidenciados componentes catódicos. A imundifusão demonstrou no entanto, a complexidade dos componentes antigênicos dessa amostra (10 componentes). Os três coelhos responderam igualmente ao imunógeno. O comportamento, à imunoeletroforese, dos soros obtidos nos coelhos imunizados com as amostras 2 e 18 foi semelhante àquele da amostra 192 (Figura 6) enquanto que o comportamento da amostra 265 foi semelhante àquele da amostra SN (Figura 7).

É interessante assinalar que, para a amostra SN o antígeno filtrado teve comportamento muito semelhante ao lisado, quanto a migração eletroforética e número de componentes, e o antígeno filtrado da amostra 2 revelou melhor progressão eletroforética e maior número de componentes antigênicos que o antígeno lisado. Nas demais amostras os抗ígenos lisados se demonstraram mais complexos.

Imunoeletroosmoforese - imundifusão

A Figura 8 exemplifica os resultados que podem ser obtidos com esta técnica. Mostra os resultados obtidos entre os抗ígenos filtrado à E e lisado à D contra os anti-soros homólogos da amostra SN. Foram evidenciados 13 componentes antigênicos, 7 anódicos e 6 catódicos.

Discussão

A complexidade antigênica do *P. brasiliensis* já é bem conhecida graças aos trabalhos de Yarzabal (21) que conseguiu demonstrar em filtrados da fase cotonosa até 60 componentes através da imunoeletroforese bi-dimensional. Por sua vez o padrão de comportamento dos principais componentes antigênicos à imunoeletroforese convencional foi estabelecido por Restrepo & Drouhet (10) e Conti-Diaz (2). Em tais pesquisas foram utilizados soros hiperimunes de coelhos e soros de pacientes de paracoccidioidomicose. Além da complexidade antigênica do *P. brasiliensis*, foram feitas comparações entre as fases cotonosa e leveduriforme e a demonstração dos componentes antigênicos compartilhados com fungos de outros gêneros.

Justificava-se, a nosso ver, pesquisa em que se procurasse demonstrar as possíveis diferenças entre várias amostras da mesma espécie. Para tanto, foram produzidos soros hiperimunes para cada uma de 5 amostras de *P. brasiliensis*. A técnica de produção utilizada na obtenção dos soros hiperimunes, bem como, a avaliação da potência dos mesmos, através de reações de fixação do complemento quantitativas, foi objeto de publicação anterior (15).

Aqui são apresentados os resultados obtidos no estudo imunoquímico por reações de

imunodifusão dupla, imunoeletroforese e imunoeletroosmoforese-imunodifusão com a utilização de soros hiperimunes próprios de cada amostra e antígenos filtrados e lisados obtidos da fase leveduriforme.

Inicialmente deve-se assinalar que houve diferenças de resposta entre os três animais imunizados com a mesma amostra, demonstradas também através do estudo imunoquímico (Figura 6).

A imunodifusão dupla executada sobre lâminas de microscópia e lâminas de vidro de 75 x 100mm foi capaz de demonstrar no mínimo um componente antigenico comum a todas as amostras (Figura 1 e 2, frente ao antígeno filtrado e Figura 5 com antígeno lisado). O modelo utilizado na Figura 5 foi o que melhor permitiu a comparação entre as amostras. A presença de componentes antigenicos próprios da amostra pode ser demonstrada nas Figuras 1, 2, 4 e 5). Os modelos de imunodifusão que permitiam melhor evidenciação entre identidade e não identidade dos componentes antigenicos das várias amostras foram aqueles de imunodifusão circular Figura 2, 4 e 5. Os antígenos lisados se demonstraram mais complexos que os filtrados e as reações de imunodifusão foram mais nítidas, com faixas de precipitação mais intensas com os antígenos lisados do que com os filtrados. A exceção se verificou com os antígenos e anti-soros da amostra 2. Através da imunodifusão dupla as amostras 192 e SN demonstraram maior complexidade antigenica. A amostra SN demonstrou-se particularmente complexa sendo possível revelar através da imunodifusão dupla até 7 componentes antigenicos frente a soro homólogo (Figura 3).

A imunoeletroforese, como demonstrado nas Figuras 6 e 7, permitiu melhor evidenciação da complexidade antigenica das amostras. Foram demonstrados até 10 componentes antigenicos frente aos anti-soros homólogos. A Figura 6 exemplifica o padrão imunoeletroforético obtido com a maioria das amostras e que é semelhante aos descritos por Restrepo e Drouhet (10) e Conti-Diaz (2). A Figura 7 demonstra um padrão completamente diferente de distribuição dos componentes antigenicos na imunoeletroforese de antígeno lisado da amostra SN. Aqui, não houve, praticamente, a migração eletroforética dos componentes antigenicos. A complexidade antigenica da amostra evidenciou-se pela imunodifusão.

A Figura 8 exemplifica os resultados obtidos com imunoeletroosmoforese-imunodifusão. Para a amostra SN foram demonstradas até 13 faixas de precipitação. Não correspondiam a 13 componentes antigenicos como demonstrado em experiências complementares não referidas aqui. Algumas faixas correspondiam à imunodifusão do mesmo componente no lado anódico e catódico da lâmina.

A demonstração de que animais da mesma espécie respondem diferentemente a imunógenos de uma amostra de *P. brasiliensis* e que as amostras do fungo apresentam constituição antigenica diferente, permitem considerações sobre a propriedade da utilização de antígenos muito purificados no estudo imunológico dos pacientes com paracoccidioidomicose. Se, por um lado, a presença de anticorpos contra o antígeno E2 pode garantir o diagnóstico de paracoccidioidomicose, por outro, faltam estudos demonstrativos de que todos os pacientes de paracoccidioidomicose apresentam tais anticorpos. Pelo presente estudo verifica-se, por exemplo, que soros de animais, imunizados com antígenos de outras amostras não demonstraram anticorpos que reagissem com os antígenos próprios da amostra SN (Figura 2). Supondo-se um paciente infectado com tal amostra, seria admissível a falta de resposta mais intensa ao antígeno E2, e como consequência resultaria reações negativas ou de fraca intensidade nas provas imunológicas. Ainda se consideram como muito apropriadas as conclusões de Friedman & Conant (5) sobre a melhor adequação de antígeno mais complexo no estudo imunológico dos pacientes de paracoccidioidomicose. Ainda mais, considerando-se que o diagnóstico da paracoccidioidomicose se faz, essencialmente, através de exames microbiológicos, deve-se considerar que, para o estudo imunológico, importa a utilização de antígenos que tenham melhor desempenho e não aqueles que possam firmar o diagnóstico, a não ser em casos muito especiais. O estudo imunológico dos pacientes de paracoccidioidomicose propicia elementos essenciais na classificação das formas de moléstia e, em consequência na avaliação do prognóstico de cada caso. Fornece, ainda mais, dados valiosos para se acompanhar o tratamento dos pacientes e serve, como nenhuma outra informação, de critério de cura dos pacientes.

Referências Bibliográficas

1. Conti-Díaz, I.A.; Somma-Moreira, R.E.; Gezuele, E.; Gimenéz, A.C. de; Pena, M.I.; Mackinnon, J.E. - Immunoelctroosmophoresis-immunodiffusion in paracoccidioidomycosis. *Sabouraudia*, 11:39-41, 1973.
2. Conti-Díaz, I.A.; Mackinnon, J.E.; Calegari, L.; Casserone, S. - Estudio comparativo de la immunolectrophoresis (IEF) y de la immunoelctroosmophoresis immunodifusion (IEOF-IN) aplicadas al diagnostico de la paracoccidioidomicosis. *Mycopathologia*, (Den Haag), 63:161-5, 1978.
3. Fava-Netto, C. - Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 21:99-194, 1961.
4. Fava-Netto, C.; Vegas, V.S.; Sciannaméa, I.M.; Guarnieri, D.B. - Antígeno polissacarídico do *Paracoccidioides brasiliensis*. Estudo do tempo de cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis* necessário ao preparo do antígeno. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11:177-81, 1969.
5. Friedman, L. & Conant, N.F. - Immunologic studies on the Etiologic agents of North and South American Blastomycosis. II Comparison of serologic reactions. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 6:713-24, 1953.
6. Lacaz, C.S.; Ferri, R.G.; Fava-Netto, C.; Belfort, A.E. - Aspectos imunoquímicos na blastomicose sul-americana e blastomicose queloideana (Doença de Jorge Lobo). *Med. Cir. Farm.*, 298:63-74, 1962.
7. Mackenzie, D.W.R.; Philpot, C.M.; Proctor, A.G.J. - Basic serodiagnostic methods for diseases caused by fungi and Actinomycetes. Public. Health Laboratory Service. 12 Monograph series, 1-44, 1980.
8. Manochá, M.S. - Lipid composition of *Paracoccidioides brasiliensis*: Comparison between the Yeast and mycelial forms. *Sabouraudia*, 18:281-6, 1980.
9. Restrepo, A.M. - Serological comparison of the two morphological phases of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Infect. Immun.*, 2:268-73, 1970.
10. Restrepo, A. & Drouhet, E. - Etude des anticorps précipitants dans la blastomycoses sul-américane par l'analyse immunoélectrophorétique des antigènes de *Paracoccidioides brasiliensis*. *An. Inst. Pasteur*, 19:338-346, 1970.
11. San-Blás, F.; San-Blás, G. & Cova, L.J. - A morphological mutant of *Paracoccidioides brasiliensis* strain IVIC Pb 9 isolation and wall characterizations. *J. Gen. Microbiol.*, 93:209-18, 1976.
12. San-Blás, F. & Centeno, S. - Isolation and preliminary characterization of auxotrophic and morphological mutants of the yeastlike form the *Paracoccidioides brasiliensis*. *Bacteriol.*, 129:138-44, 1977.
13. San-Blás, F.; San-Blás, G. - Bioquímica y dimorfismo en *Paracoccidioides brasiliensis*. In: *Paracoccidioidomicose: Blastomicose sul americana*. Ed. G. Del Negro, C.S. Lacaz, A.M. Fiorillo. São Paulo, Sarvier EDUSP, 1982, p.35-58.
14. Scroferneker, M.L. - Contribuição para o estudo da composição antigenica do *Paracoccidioides brasiliensis* - Comparação entre 5 amostras. São Paulo, 1982. (Tese - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
15. Scroferneker & Cols., - Soros hiperimunes anti-*Paracoccidioides brasiliensis*. Trabalho a ser publicado na Revista Brasileira de Microbiologia - V. 19 (3). São Paulo.
16. Siqueira, A.M. Avaliação da sensibilidade e especificidade de algumas provas sorológicas no diagnóstico, prognóstico e controle de cura da paracoccidioidomicose: Caracterização imunoquímica do antígeno E₂ do *Paracoccidioides brasiliensis*. São Paulo, 1982. (Tese - Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
17. Torres, J.M.; Da Luz, S.; Lopez-Lemes, M.H.; Guisante, J.; Josef, M.; Nieto, A.; Coch, J. & Yarzábal, L.A. - Evaluación de la reactividad de um antígeno purificado de *Paracoccidioides brasiliensis* frente a sueros de Paracoccidioidomicosis e Histoplasmosis. *Ann. Parasitol. (Paris)*, 50(4):507-13, 1975.
18. Yarzábal, L.A.; Torres, J.M.; Josef, M.; Vigna, I.; Da Luz, S. & Andrieu, S. - Antigenic mosaic of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Pan American Symposium on Paracoccidioidomycosis, 19, Medellin, 1971. Proceedings, Washington, PAHO, 1972, p.239-44. (Scient. Publ. nº 254).

- 19.Yarzábal, L.A.; Biguet, G.; Vaucelle, T.; Andrieu, S.; Torres, J.M.; Da Luz, S. - Analis Inmunoquimica de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 11:80-8, 1973.
- 20.Yarzábal, L.A.; Bout, D.; Naquira, F.; Fruit, J.; Andrieu, S. - Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunolectrophoretic Band E. *Sabouraudia*, 15:79-85, 1977.
- 21.Yarzábal, L.A. - Composición antigenica de *Paracoccidioides brasiliensis*. In: *Paracoccidioidomicose: Blastomicose sul-americana*. Ed. G. Del Negro, C.S. Lacaz, A.M. Fiorillo, São Paulo, Sarvier/EDUSP, 1982, p. 59-67.

SENSIBILIDADE DE PYTHIUM SPLENDENS BRAUN A IONS DE METAIS PESADOS

Yvo de Carvalho

Universidade Federal de Goiás

Deptº Fitossanitário - Escola de Agronomia Recebido para publicação em 14/12/87

Caixa Postal 131

74000 Goiânia GO, Brasil

& Adauto Ivo Milanez

Instituto de Botânica

Secção de Micologia e Líquenologia

Caixa Postal 4005

01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Acumulação de resíduos de metais pesados no solo e seus efeitos sobre a microbiota constituem aspectos importantes em ecologia de fungos do solo. *Pythium splendens* Braun mostrou-se sensível ao cobre "in vitro" em CMA-10, mas não no solo, a 100 μ g/g. A população do fungo foi reduzida em solo contendo mercúrio, a 10 μ g/g., e suprimida a 100 μ g/g. Zinco foi pouco tóxico tanto no solo quanto "in vitro", inibindo mais acentuadamente a esporulação do que o crescimento micelial. A permanência de cepas, por 60 dias, em solo contendo íons de cobre, mercúrio ou zinco, ou o cultivo repetido em meio contendo qualquer desses íons, não induziu aumento na tolerância.

Summary

Sensitivity of Pythium splendens Braun to heavy metals

Heavy metals residues accumulation in soil and their effects on microbiota constitute important aspects of the ecology of soil fungi. *Pythium splendens* Braun was sensitive to copper "in vitro" in CMA-10 medium, but not in soil, at 100 μ g/g. The population was reduced in soil containing mercury, at 10 μ g/g., and suppressed at 100 μ g/g. Zinc showed low toxicity to *P. splendens* both in soil and "in vitro", and affected sporangia production more strongly than micelial growth. Isolates that survived for at least 60 days in soil containing metallic ions, or repeated cultivation in medium containing metallic ions, did not display increase in tolerance.

Introdução

Os efeitos de resíduos metálicos, particularmente de cobre (Cu^{++}) e de mercúrio (Hg^{++}) sobre células fúngicas, têm interessado principalmente à fitopatologia, devido à ação fungicida desses íons (12). Fungicidas usados em tratamentos de sementes ou pulverizações de partes áereas de plantas, geralmente atingem o solo podendo afetar a atividade microbiana (16). Fatores como pH, presença de compostos orgânicos quelantes e de fermentos, e concentração do meio de cultura, podem influenciar sobre a disponibilidade do íon metálico para o fungo, afetando sua

fungitoxicidade. Metais eletronegativos, como cobre, mercúrio e prata, têm grande afinidade com grupos sulfidrilas, amino e imino, sendo portanto muito reativos com diversas enzimas (12). *Aspergillus niger* foi protegido da ação tóxica do mercúrio pelos compostos sulfidrilados cisteína e glutationa, o mesmo não ocorrendo com *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* (1).

Populações de *Plasmiodiophora brassicæ* tornaram-se tolerantes ao mercúrio em solos onde calomelano ($HgCl_2$) foi usado durante vários anos, e evidências experimentais indicaram que houve seleção dessa população no solo (15). A aplicação repetida de fungicidas organo-mercuriais, induziu cepas de *Leptosphaeria nodorum* à tolerância ao mercúrio, tendo o cultivo sucessivo em concentrações crescentes do íon aumentado essa tolerância (7).

Pythium splendens mostrou-se sensível ao fenil acetato de mercúrio e ao óxido cuproso, com inibição total do crescimento miceliano em concentrações de 10 a 50 ppm, respectivamente (3). Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* somente cresceram em meio contendo cobre, na concentração de 75 a 100 μg , após um período de adaptação, tolerância essa perdida após cultivo repetido na ausência de cobre (13). Com pré-cultivo em meio contendo íon metálico, cepas de fungos tolerantes ao cobre, cádmio, zinco e arsênio foram obtidas a partir de solos poluídos com resíduos de mineração (14).

A adição de zinco ao solo, na concentração de 45 a 135 $\mu g/g$ reduziu a nodulação por *Rhizobium sp* e infecção por fungo micorrízico em feijoeiros do cultivar "Pinto" (10). Poluentes derivados de atividades agrícolas, domésticas ou industriais, acumulam-se em certos ambientes, afetando a ecologia, atividade e dinâmica de população da micota indígena (2). Zinco, a 10 miliomoles, inibiu o crescimento miceliano de *Rhizoctonia solani*, e reduziu o de *Fusarium solani*, *Cunninghamella echinulata*, *Aspergillus niger* e *Trichoderma viride*.

No presente trabalho objetivou-se determinar a tolerância de *Pythium splendens* ao cobre e zinco, tanto no solo quanto em meio de cultura. Estudou-se também a eventual ocorrência de seleção, a curto prazo, no sentido de tolerância em populações sobreviventes de solos contendo os íons metálicos, ou em cepas sucessivamente cultivadas em meio contendo o íon.

Materiais e Métodos

A cepa de *Pythium splendens* Braun utilizada foi obtida a partir de plântulas de pimenta-do-reino (*Piper nigrum L.*) (3), em 1979, no Estado do Pará (Brasil). As culturas de fungo foram mantidas, no período de 1980 a 1982, em solo autoclavado, com umidade de 16%, correspondente a 50% da capacidade de campo, sob temperatura ambiente, e também em culturas puras em tubos "Cornmeal agar" Difco (17g/l), adicionado de penicilina G sódica (100 $\mu g/ml$), sulfato de estreptomicina (50 $\mu g/ml$), denominado CMA-10. A suspensão de antibióticos foi adicionada ao meio fundente após a autoclavagem (120°C/30 min.).

Efeito de íons metálicos no solo - Utilizou-se Latossolo Vermelho-Escuro, procedente do município de Goiânia (GO), argilo-arenoso, pH 5,1, baixa fertilidade, e capacidade de campo de 32,6%. Os íons metálicos testados foram cobre (Cu^{++}) e mercúrio (Hg^{++}) nas concentrações de 10 e 100 μg do íon/g e zinco (Zn^{++}) a 50 e 500 $\mu g/g$ de solo infestado com *P. splendens*. Os sais usados como fontes de íons foram cloretos. Foram realizados três ensaios, sendo a população inicial de *P. splendens* de 1220, 995 e 1200 pv/gss (propágulos viáveis/grama de solo seco), determinada pelo método de frequência em diluições em placa (6), modificado por outros autores (9), em meio CMA-10. Após a incorporação do íon metálico, três alíquotas de 100g de solo infestado foram acondicionadas em sacos plásticos (10x25cm), os quais foram cuidadosamente fechados, envolvidos em papel alumínio e incubados a 25°C. Procedeu-se à tomada da população de *P. splendens* nas alíquotas de solo após 15, 30, 45 e 60 dias de incubação.

O delineamento experimental usado foi o de parcelas subdivididas em blocos casualizados. Na análise estatística os dados foram transformados em log $\sqrt{}$ %.

Efeito de Ions metálicos "in vitro" - Os íons metálicos de (Cu^{++}), (Hg^{++}) e (Zn^{++}), todos provenientes de cloretos, foram incorporados ao CMA-10 fundente (43-50°C) em suspensão no próprio meio de cultura. As concentrações testadas, expressas em $\mu\text{m/ml}$ de CMA, foram 5, 10, 25 de Cu^{++} , 10, 25, 50 e 75 Hg^{++} , e 200, 300, 400 e 500 de Zn^{++} , indicadas como possíveis faixas limitantes para o crescimento do fungo em testes preliminares. A testemunha foi CMA-10 sem adição de íon metálico. Após a solidificação do meio nas placas-de-petri, procedeu-se a inoculação por indexação, utilizando-se a espátula dupla de Carvalho (4).

Mediu-se a taxa de crescimento miceliano, utilizando régua milimetrada, e a taxa de esporulação (esporângios/ mm^2), usando o disco quadriculado aclopado a um estereomicroscópio Zeiss (4).

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com cinco repetições e três ensaios.

Tolerância induzida - Cepas de *P. splendens* sobreviventes, após 60 dias, em solo com concentrações mais elevadas dos íons metálicos, foram testadas "in vitro" para verificar se houve seleção no sentido de tolerância. As concentrações testadas, expressas em $\mu\text{g/ml}$ de CMA-10, foram 10 e 20 de Cu^{++} e de Hg^{++} , e 250 e 400 de Zn^{++} , consideradas faixas críticas para o fungo. A inoculação foi por indexação, em culturas pareadas do isolado remanescente de solo com o respectivo íon metálico, isolado e mantido em cultura em CMA-10. Nos demais aspectos, o procedimento experimental foi semelhante ao ensaio anterior. Foram submetidos à análise estatística os coeficientes de taxas de crescimento miceliano e de esporulação de cepas remanescentes de solos com íon metálico sobre taxas de cepas mantidas em culturas em CMA-10.

Resultados e Discussão

Efeito de Ions metálicos no solo - A flutuação populacional de *P. splendens* em solos adicionados de íons metálicos está expressa na Tabela 1. Em solo com 16% de umidade, não adicionado de íon metálico (testemunha) a população de *P. splendens* permaneceu estável nos primeiros 45 dias dos ensaios, reduzindo-se significativamente entre 45 e 60 dias. Nos tratamentos com adição de cobre (10 e 100 $\mu\text{g/g}$) ou zinco (50 e 500 $\mu\text{g/g}$) a população do fungo permaneceu estável e equivalente à população inicial durante 60 dias. Em solo adicionados de mercúrio, à 100 $\mu\text{g/g}$, houve efeito de impacto inicial, com redução significativa da população do fungo nos primeiros dias, e permanecendo estável até os 60 dias. A 100 $\mu\text{g/g}$, o mercúrio causou supressão do fungo no solo no início dos ensaios. Pela observação dos efeitos totais de tratamentos, evidencia-se a toxicidade do mercúrio para *P. splendens*. Nos primeiros 45 dias somente houve diferenças significativas entre as populações dos tratamentos que receberam mercúrio e os demais, mas não destes entre si.

Esses resultados coincidem parcialmente com aqueles obtidos por Cardoso & Albuquerque (3), em relação à maior sensibilidade de *P. splendens* a compostos mercuriais do que cuprícios. A incorporação de cloreto de mercúrio ao solo, na proporção de 0,1 a 0,5%, reduziu significativamente a micota (11).

A flutuação populacional de *P. splendens* na presença de concentrações relativamente elevadas de zinco (500 $\mu\text{g/g}$) não foi significativa. Resultados semelhantes foram encontrados por Babich & Stotzky (2) em relação a diversos fungos do solo, incluindo os fungos micorrízicos (5). Essa tolerância (13), pode advir de sobrevivência prolongada da cepa na presença de íon metálico.

Efeito de Ions metálicos "in vitro" - As taxas de crescimento miceliano e de esporulação, expressas na Tabela 2, mostram que, "in vitro", o fungo foi mais sensível ao cobre que ao mercúrio. As concentrações mínimas de íons de cobre, mercúrio e zinco necessárias para suprimir o crescimento miceliano foram 25, 75 e 500 $\mu\text{g/ml}$ de meio de cultura, respectivamente. A inibição da esporulação na presença de cobre ou mercúrio ocorreu nas mesmas concentrações que suprimiram o crescimento miceliano, enquanto que, em meios contendo zinco, a concentração mínima para inibir

a formação de esporângios foi de 400 $\mu\text{g}/\text{g}$. A presença de cobre no meio de cultura inibiu mais acentuadamente a esporulação que o crescimento miceliano, enquanto que na presença de mercúrio, até 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, a formação de esporângios não foi afetada significantemente. Zinco mostrou-se pouco tóxico para *P. splendens*, revelando-se, mais eficaz como inibidor da esporulação do que do crescimento miceliano.

Tolerância induzida - Nas culturas pareadas, conforme resultados expressos na Tabela 3, não se observou a indução de tolerância ao íon nas cepas remanescentes de solos contendo o íon. A ocorrência de relações sempre menores que 1,0 na esporulação parece indicar ligeiro enfraquecimento das cepas sobreviventes do solo contendo íon metálico, mas as diferenças, em relação à testemunha, não foram significativas. Em cultivos do fungo em meios contendo cobre, mercúrio e zinco, em concentrações ligeiramente abaixo do nível crítico, não se observou tendência para elevação da taxa de

Tabela 1 - Flutuação populacional de *P. splendens* em solos adicionados de íons metálicos. Resultados expressos em log %.

Símbolos: * = Excluído de análise estatística devido à ausência de variabilidade; ** = Média de 3 ensaios com 3 repetições; *** = Médias seguidas de mesma(s) letra(s) na linha ou na coluna diferem estatisticamente entre si (Tukey 5%).

Tratamentos	Épocas				Efeito total de tratamento
	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	
Testemunha	0,9664**a***	0,9742a	0,9755a	0,9145b	0,9576 B
ug/g	a	a	a	b	
Cu 10	1,0237a	0,9975a	1,0136a	0,9932a	1,0070 A
a	a	a	a	a	
Cu 100	0,9770a	0,9993a	0,9991a	0,9609a	0,9840 A
a	a	a	a	a	
Hg 10	0,8734a	0,8883a	0,9060a	0,8798a	0,8869 C
b	b	b	c	c	
Hg 100*	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00 -
a	a	a	a	a	
Zn 50	0,9914a	0,9715a	0,9868a	0,9926a	0,9856 A
a	a	a	a	a	
Zn 500	0,9977a	0,9681a	0,9996a	0,9556a	0,9803 A
a	a	a	a	a	
Efeito total de época	0,9716	0,9665	0,9801	0,9494	
C.V. - Resíduos A (Parcelas) = 6,25%					
C.V. - Resíduos B (Sub-parcelas) = 3,80%					
DMS (Tukey) Nível 1% Nível 5%					
T (trat.)	0,0511	0,0424			
E (épocas)	0,0225	0,0184			
B (blocos)	0,0309	0,0244			
T x E	0,0729	0,0645			
T d. E	0,0711	0,0599			
E d. T	0,0531	0,0452			

Tabela 2 - Taxas de crescimento miceliano (T_m) e de esporulação (T_e) de *P. splendens* "in vitro" na presença de íon metálico.

Símbolos: * = Excluídos de análise estatística devido à ausência de variabilidade; ** = Média de 3 ensaios com 5 repetições; *** = Médias seguidas de mesma(s) letra(s) não diferem estatisticamente entre si.

Tratamentos	$T_m(\text{mm/dia})$	T_e (esporângios/ mm^2)	
Testemunha	24,72** A***	38,20	A
ug/ml			
Cu 5	19,60	B	11,96 BC
Cu 10	9,50	D	1,00 C
Cu 25*	0,00	-	0,00 -
Hg 10	21,36	B	32,20 A
Hg 25	12,82	C	35,60 A
Hg 50	0,54	E	4,60 BC
Hg 75*	0,00	-	0,00 -
Zn 200	13,76	C	17,00 B
Zn 300	8,50	D	2,00 C
Zn 400	1,76	E	0,00* -
Zn 500*	0,00		0,00
C.V. (%)	10,17		35,85
DMS (Tukey 5%)	2,66		13,10

Tabela 3 - Comportamento de cepas de *P. splendens* mantidas em meio de cultura (SRM) e cepas remanescentes de solos (RM) contendo resíduos metálicos. Dados expressos pela relação RM/SRM em culturas pareadas em CMA-10 adicionado de resíduo respectivo.

Símbolos: * = Excluídos da tabela devido à ausência de esporulação e/ou crescimento miceliano; ** = Médias de três ensaios com cinco repetições.

Tratamentos	Coeficiente de crescimento miceliano	Coeficiente de esporulação
Testemunha	1,005**	1,078
ug/ml		
Cu 10	0,918	0,739
Cu 20*	-	-
Hg 10	1,149	0,751
Hg 20	1,033	0,887
Zn 250	0,995	0,915
Zn 400	0,929	-
C.V. (%)	22,961	33,668
Tukey 5%	0,451	0,557

crescimento micelial e/ou de esporulação, como relatado para *Leptosphaeria nodorum* (7) e para *Saccharomyces cerevisiae* (13). Em se tratando de cepa heterotálica, mantida em solo autoclavado ou em culturas puras, é de se esperar que se trata de material genético com pouca ou nenhuma variabilidade dai esses resultados não serem totalmente inusitados.

Os resultados, aparentemente contrastantes, obtidos nos tratamentos com cobre no solo e em meio de cultura sugerem a formação de complexos menos tóxicos ou inócuos para o fungo no solo, ou que tenha havido interação do cobre com estreptomicina, com formação de quelatos tóxicos no meio de cultura (8). Com relação ao zinco, observa-se que, na concentração de 500 μ g/ml houve supressão do fungo em meio de cultura, mas não no solo, indicando que neste provavelmente outros fatores, além da concentração de zinco, influenciaram na sobrevivência, conforme observação citada por outro autor (12).

Agradecimentos

Os autores desejam expressar seus agradecimentos à Seção de Micologia e Líquenologia do Instituto de Botânica de São Paulo, onde esse trabalho foi desenvolvido.

Referências Bibliográficas

1. Ashworth, L.J. & Amin, J.V. - A mechanism for mercury tolerance in fungi. *Phytopathology*, 54:1459-1463, 1964.
2. Babich, H. & Stozky, G. - Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and coliphages: influence of the chloride ions. *Applied and Environmental Microbiology*, 36(6):906-914, 1978.
3. Cardoso, J.E. & Albuquerque, F.C. - Podridão radicular e tombamento de plântulas de pimenta-do-reino causada por *Pythium splendens* Braun. *Fitopatologia Brasileira*, 4(1):17-24, 1979.
4. Carvalho, Y. - Dinâmica de população de *Pythium splendens* Braun no solo. São Paulo, Instituto de Biociências/USP, 1983. (Tese de Doutoramento).
5. Gildon, A. & Tinker, P.B. - A heavy metal-tolerant strain of a mycorrhizal fungus. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 77:648-649, 1981.
6. Harris, R.F. & Sommers, L.E. - Plate-dilution frequency technique for assay of microbial ecology. *Applied Microbiology*, 16(2):330-334, 1968.
7. Harrower, K.M. - Tolerance of *Leptosphaeria nodorum* to an organomercurial compound. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 66:523-525, 1976.
8. Kimati, I. - Fungicidas. In: *Manual de Fitopatologia*, Vol. I 2^a ed., Ed. Agronômica Ceres, p. 325-373, 1978.
9. Lumsden, R.D.; Ayedes, W.A. & Dow, R.L. - Differential isolation of *Pythium* species from soil by means of selective media, temperature, and pH. *Phytopathology*, 65:606-612, 1975.
10. Mc Ilveen, W.D.; Spotts, R.A. & Davis, D.D. - The influence of soil zinc on nodulation, micorrhizae, and ozone-sensitivity of Pinto bean. *Phytopatology*, 65:647-648, 1975.
11. Rai, B. & Tiwari, V.K. - Effect of a toxic chemical on soil mycoflora. *Acta Botanica Indica*, 3:19-22, 1975.
12. Ross, I.S. - Some effects of heavy metals on fungal cells. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 64:175-193, 1975.
13. Ross, I.S. & Walsh, A.L. - Resistance to copper in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 77:27-32, 1981.
14. Tatsuyama, K.; Egawa, H.; Yamamoto, H. & Inoue, K. - Influence of metallic compounds on soil microflora in farm polluted by the chemicals. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 15:246-250, 1974.
15. Tingall, S.H. & Webster, J. - Mercury tolerance in *Plasmodiophora brassicae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 76:191-195, 1981.
16. Wainwright, M. & Pugh, G.I.F. - Effects of fungicides on the numbers of microorganisms and frequency of cellulolytic fungi in soil. *Plant and Soil*, 43:561-572, 1981.

SOROS HIPERIMUNES ANTI-PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS

Maria Lúcia Scroferneker

Deptº de Microbiologia
Instituto de Biociências da UFRGS
90050 Porto Alegre, Brasil

Recebido para publicação em 14/12/87

Celeste Fava Netto

Laboratório Bio-Ciência/Lavoisier
Av. Angélica, 1832
01228 São Paulo SP, Brasil

A.L.O. Schalch

Laboratório Bio-Ciência/Lavoisier
Av. Angélica, 1832
01228 São Paulo SP, Brasil

A.A. Mota Neto

Deptº de Ciências Morfológicas
Instituto de Biociências da UFRGS
90050 Porto Alegre, Brasil

Resumo

Quinze soros hiperimunes, contra 5 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, foram produzidos em coelhos brancos da raça Nova Zelândia, sendo utilizados 3 coelhos para cada amostra do fungo. O imunógeno era constituído por mistura de 0,3ml de lisado, 0,2ml de filtrado, 0,5ml de suspensão de células leveduriformes vivas e 0,1ml de adjuvante de Freund completo. Inoculações semanais, durante 10 semanas, de 0,5ml da mistura, foram aplicadas, por via subcutânea nas regiões axilares dos coelhos. Os anti-soros obtidos foram experimentados em reações de fixação do complemento, precipitação em meio líquido, dupla difusão em gel de ágar, imunoelioforese e imunoeletrosmoforese. Os resultados obtidos justificam esta publicação.

Summary

Fifteen immune sera, against five *Paracoccidioides brasiliensis* strains, were produced in New Zealand white rabbits, 3 rabbits for each strain of the fungi. The immunogen was made up by a mixture of 0,3ml lysate, 0,2ml filtrate, 0,5ml alive yeast-like cells suspension and 0,1ml of complete Freund adjuvant. Weekly subcutaneous injections of 0,5ml mixture, 10 weeks along, were done in each axillary of the animals. The immune sera were analysed by complement fixation, precipitin in liquid media, double immunodiffusion, immunoelectrophoresis and immunoelctroosmophoresis reations with very good performances.

Introdução

A dificuldade encontrada na produção de soros hiperimunes anti-*Paracoccidioides*
Rev. Microbiol., São Paulo, 19(3):311-316, Jul./Set. 1988.

brasiliensis é reconhecida por todos os interessados no assunto.

Vários processos de imunização para produção de soros-imunes já foram pesquisados tendo como finalidade o estudo da composição antigênica dos fungos, a caracterização de抗原os específicos e dos anti-soros obtidos, visando facilitar, também, o diagnóstico laboratorial das micoses (1, 2, 3, 9, 11, 12, 13, 14 e 15).

A finalidade desta publicação é demonstrar os bons resultados obtidos na produção de soros hiperimunes anti-*Paracoccidioides brasiliensis*.

Material e Métodos

1. Amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* - Foram utilizadas as amostras 2, 18, 192, 265 e SN mantidas pelo Prof. Fava Netto, que as usa há muitos anos na produção de抗原os.

2. Animais para imunização - Quinze coelhos machos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) foram imunizados. Pesavam aproximadamente 3kg e cada amostra de *P. brasiliensis* foi injetada em 3 coelhos.

3. Antígenos utilizados como imunógenos

3a. Lisado - Obtido segundo a técnica descrita por Lacaz & Col. (7), 1962, modificada (10). O cultivo foi feito no meio de Fava Netto & Col. (6) à temperatura de 36,5°C, durante 4 semanas. A suspensão das células leveduriformes foi feita em solução de NaCl 0,85%, mertiolatada a 1:500m. Mantida em geladeira durante 7 dias. Acrescentou-se suspensão "pérolas de vidro" na produção de 2 vezes o volume da suspensão celular, procedendo-se à Trituração em Virtis (Virtis homogeniser 45) durante 100 minutos a 45.000rpm, com o aparelho imerso em gelo. Após centrifugação e diálise durante 24 horas contra água destilada, com trocas da água cada hora, durante as primeiras 8 horas, o lisado foi concentrado aproximadamente 20 vezes, por pervaporação, à temperatura ambiente.

3b. Filtrado - Obtido pelo cultivo do fungo em meio de Fava Netto & Col. (6), sob a forma líquida, em estufa a 30°C, sob agitação contínua de vai e vem, durante 4 semanas, acrescentando-se então, mertiolato a 1:5000 e agitado por mais 7 dias. O filtrado obtido foi concentrado aproximadamente 100 vezes, por pervaporação, à temperatura ambiente.

3c. Suspensão de células leveduriformes - Obtida após cultivo do fungo em meio de Fava Netto & Col. (6), durante 4 semanas a 36,5°C. Suspensão em solução aquosa de NaCl a 0,85% ajustada de acordo com o tubo 5 da escala de MacFarland.

4. Antígenos utilizados nas reações sorológicas

4a. Antígeno polissacarídico - Antígenos polissacarídicos, preparados segundo Fava Netto & Col. (6), obtidos separadamente de cada amostra do fungo e de uma mistura de 8 amostras, foram utilizados em reações de precipitação em meio líquido e de fixação do complemento (5).

4b. Antígenos filtrado e lisado - Preparado como descrito acima foram usados em reações de imunodifusão dupla e imunoelétroforese e contra-imunoelétroforese. Os resultados obtidos com estas técnicas serão objeto de publicação posterior.

4c. Concentração proteica dos抗原os lisados e filtrados - Determinada pelo método de Lowry & Col. (8).

5. Soros hiperimunes - Foram preparados, essencialmente, segundo técnica preconizada por Yarzábal & Col. (14). Cada injeção, realizada por via sub-cutânea nas regiões axilares, continha a seguinte mistura antigênica: 0,5ml de suspensão de células leveduriformes vivas; 0,3ml de lisado; 0,2ml de filtrado e 0,1ml de adjuvante completo de Freund. Quinze coelhos, brancos, pesando em média 3Kg, de raça Nova Zelândia, receberam injeções de 0,5ml da mistura antigênica em cada

região axilar, semanalmente, durante 10 semanas. Foram inoculados 3 coelhos para cada amostra de *P. brasiliensis*. Sangramento por punção cardíaca. A separação dos soros foi feita assepticamente. Adição de mertiolato a 1:5000 e conservação em congelador a menos 15°C.

6. Avaliação dos soros hiperimunes - A atividade dos soros hiperimunes foi avaliada através de reações de fixação do complemento e de precipitação em meio líquido.

7. Reação de fixação do complemento - Realizada pela técnica quantitativa de Wadsworth, Maltaner & Maltaner, conforme padronizada por Fava Netto (4, 5) para o sistema paracoccidioidomicose.

8. Reação de precipitação em meio líquido - Realizada conforme Fava Netto (5).

9. Dosagem de proteínas - Realizada segundo Lowry & Col. (8).

Resultados

Inicialmente foi avaliada a potência dos 15 soros hiperimunes, frente ao antígeno polissacarídico obtido de 8 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, pela reação de fixação de complemento quantitativa.

Os resultados estão representados na Tabela 1. Os títulos obtidos, segundo a reação quantitativa de Wadsworth, Maltaner & Maltaner, variaram de 21 a 492. A mesma Tabela demonstra o fraco desempenho dos soros hiperimunes em reações de precipitação em meio líquido.

Tabela 1 - Caracterização imunológica dos 15 soros hiperimunes, obtidos contra 5 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Reações realizadas com antígeno polissacarídico misto, obtido de 8 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*.

Símbolos: Título do soro = unidades (50% de hemólise) de complemento, fixadas por 0,05ml de soro.

Imunógeno Amostra	Soro nº	Reação de fixação do complemento Título do soro*	Reação de precipitação
2	1	146	+
	2	377	+
	3	155	-
	4	90	-
18	5	316	++
	6	492	++
	7	145	-
192	8	62	-
	9	21	-
	10	414	+
265	11	168	++
	12	206	+
	13	119	-
SN	14	240	-
	15	178	-

Tabela 2 - Títulos dos抗ígenos (polissacarídico) das 5 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* (2, 18, 192, 265 e SN), frente a 10 unidades de anticorpos dos soros hiperimunes, homólogos e heterólogos.

Símbolos: Títulos dos抗ígenos = unidades (50% de hemólise) de complemento, fixadas por 1ml antígeno.

Imunógeno	Soro nº	Amostras de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>				
		2	18	192	265	SN
2	1	5000	5000	7500	7500	1500
	2	1000	1500	5000	3000	1500
	3	600	1500	5000	5000	600
	4	2250	3000	5000	3000	1500
18	5	3000	4000	5000	4000	600
	6	1250	3000	5000	5000	800
	7	2250	1500	5000	4000	800
192	8	2250	1250	4000	450	1500
	9	6250	5000	6250	3000	1000
	10	1500	800	4000	2250	800
265	11	1500	4000	5000	4000	800
	12	1250	800	1500	3000	600
	13	8000	8000	8000	8000	8000
SN	14	7500	1500	8000	8000	7500
	15	180	1250	3000	3000	800

Com a utilização de 10 unidades fixadoras de complemento, para cada soro hiperimune, foram avaliadas as atividades dos抗ígenos polissacarídicos homólogos e heterólogos, obtidos, separadamente, das 5 amostras de *P. brasiliensis*. Os resultados estão referidos na Tabela 2 e demonstram que os抗ígenos

Tabela 3 - Titulação dos抗igenos filtrados (F) e lisados (L), obtidos de 5 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, contra 10 unidades de anticorpos de soros homólogos e heterólogos.

Símbolos: Título dos抗igenos = unidades (50%) de complemento fixadas por 1ml de抗igeno.

Antígeno	Soro 3 (Anti-2)	Soro 6 (Anti-18)	Soro 9 (Anti-192)	Soro 11 (Anti-265)	Soro 15 (Anti-SN)
2 F	31248	375	46800	2812	6125
2 L	6240	792	7500	300	7500
18 F	3996	1000	7500	5000	3000
18 L	7500	8246	7500	7500	7500
192 F	3750	1252	39060	7800	3750
192 L	9375	9375	31248	8375	9375
265 F	5000	200	7500	3960	900
265 L	4500	2988	22500	7500	996
SN F	3750	375	46875	1875	31248
SN L	31275	14000	46875	46875	46872

Tabela 4 - Concentração proteica dos抗igenos filtrados e lisados, obtidos de 5 amostras de *P. brasiliensis*.

Amostra	Antígeno	Concentração proteica mg/ml
2	filtrado	59,02
	lisado	5,86
18	filtrado	55,74
	lisado	3,72
192	filtrado	54,66
	lisado	4,13
265	filtrado	59,92
	lisado	8,23
SN	filtrado	62,77
	lisado	4,41

polissacarídicos apresentam componentes comuns, pois, em numerosos casos, os anticorpos, obtidos contra uma amostra de *Paracoccidioides brasiliensis*, revelam maiores títulos para os抗igenos obtidos de outra amostra. Dos resultados da Tabela 2 é possível, ainda, concluir que a amostra SN constitui, ótimo imunógeno, pois os coelhos 13 e 14 desenvolveram anticorpos que revelaram os maiores títulos para抗igenos homólogos e heterólogos. Na coluna correspondente à amostra SN verifica-se que o抗igeno polissacarídico obtido desta amostra foi o que se mostrou menos ativo contra os anticorpos heterólogos.

A Tabela 3 refere os resultados obtidos em reações quantitativas de fixação do complemento, nas titulações dos抗igenos filtrados e lisados de cada amostra de *P. brasiliensis*. Utilizou-se somente um anti-soro para cada amostra do fungo. Verifica-se que os抗igenos obtidos das 5 amostras apresentam componentes comuns, pois reagem com anti-soros homólogos e heterólogos. O que chama a atenção nesta Tabela é o抗igeno lisado obtido da amostra SN, que revelou altos títulos frente aos soros homólogo e heterólogo. Já como imunógeno a amostra SN não foi tão eficiente como demonstram os resultados da última coluna.

A Tabela 4 refere as concentrações proteicas dos抗igenos filtrados e lisados obtidos de cada amostra de *P. brasiliensis*. Verifica-se que os抗igenos filtrados apresentavam concentração proteica muito mais elevada que os lisados.

Discussão

A produção de soro hiperimunes anti-*P. brasiliensis* sempre constituiu problema para investigadores que trabalham em imunologia da paracoccidioidomicose. A técnica mais comumente utilizada consistia na inoculação de suspensão de células leveduriformes vivas de *P. brasiliensis* por via endovenosa em coelhos. Os anti-soros assim obtidos apresentavam potência mediocre em reações de fixação do complemento e de precipitação em meio líquido.

A utilização de técnica de imunização, semelhante à recomendada por Yarzábal & Col. (14), usando como imunógeno mistura de células leveduriformes vivas, lisado, filtrado e adjuvante completo de Freund, permitiu o preparo de anti-soros potentes aqui analisados através das reações de fixação do complemento (Tabela 1). Os anti-soros não revelaram boa atividade em reação de precipitação em meio líquido com抗igeno polissacarídico. Tais anti-soros, no entanto, quando utilizados em reações de precipitação em gel de ágar provas de Ouchterlony, imunoelétroforese e imunoelétrrosmoforese foram eficientes, como será mostrado em publicação posterior.

A partir das titulações dos anti-soros, foi possível demonstrar que a resposta foi diferente nos 3 coelhos imunizados com a mesma amostra de *P. brasiliensis* (Tabela 1).

Utilizando 10 unidades de anticorpo de cada soro, foram titulados os抗ígenos polissacarídico, filtrado e lisado obtidos de cada amostra do *Paracoccidioides brasiliensis*. Tais titulações apresentadas nas Tabelas 2 e 3 vieram demonstrar a complexidade dos anti-soros e dos抗ígenos obtidos para cada amostra. A complexidade dos抗ígenos, e as diferenças da composição antigenica de cada amostra de *P. brasiliensis* serão mostradas através das reações de dupla difusão em gel de ágar, imunoeletroforese e imunoeletrosmoforese, em publicação posterior.

Em tais reações foram utilizados os抗ígenos filtrado e lisado, já que, o抗ígeno polissacarídico não difunde bem em gel de ágar. Referimos, também, neste trabalho as concentrações protéicas dos抗ígenos lisados e filtrados (Tabela 4) para demonstrar que elas não guardaram relação com a atividade imunológica (Tabelas 2 e 3) e nas reações de imundifusão dupla e imunoeletroforese como será mostrado em publicação posterior.

Agradecimentos

Ao laboratório Bio-Ciência/Lavoisier (São Paulo) onde foram realizadas as reações sorológicas. À Sra. Carmelina de Fácio e ao Sr. Décio do Amaral de Souza pela revisão bibliográfica e controle dos animais, respectivamente.

Referências Bibliográficas

1. Andrieu, S.; Biguet, J.; Dujardin, L.; Vaucelle, T.; Étude antigenique des agents des mycoses profondes par l'analysis comparée des milieu de culture I. *Histoplasma capsulatum* & *H. duboisii*. Relations, avec *H. farciminosum*, *Gymnoascus demonbreunii*, *Blastomyces dermatitidis*, & *Paracoccidioides brasiliensis*. *Mycopathol Mycol Appl*, 39:97-108, 1969.
2. Biguet, J.; Tran Van Ky, P.; Andrieu, S.; Vaucelle, T. - Premières caractérisations d'activités enzymatiques sur les immunolectrophorégrammes des extraits antigeniques de *Histoplasma capsulatum*. Conséquences diagnostique pratiques. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 47:425-434, 1967.
3. Campo-Aasen, I.; Nacarid, A.; de Cabral, N.A.; Yarzábal, L.A. - Sub-cellular localization of antigen E/2 of *Paracoccidioides brasiliensis* an immunoenzymatic electron microscopy study. *Sabouraudia*, 18:161-171, 1980.
4. Fava Netto, C. - Estudo quantitativo sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana com抗ígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clin. Exp.* (São Paulo), 18:197-254, 1955.
5. Fava Netto, C. - Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana). *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 21:99-194, 1961.
6. Fava Netto, C.; Vegas, V.S.; Sciannamia, I.M.; Guarnieri, D.B. - Estudo do tempo de cultivo do *Paracoccidioides brasiliensis* necessário ao preparo do抗ígeno. *Rev. Inst. Med. Trop.* (São Paulo), 11:177-181, 1969.
7. Lacaz, C.S.; Ferri, R.G.; Fava Netto, C.; Belfort, A.E. - Aspectos imunoquímicos na blastomicose sul-americana e blastomicose queloidiana (Doença de Jorge Lobo). *Med. Cir. Farm.*, 298:63-64, 1962.
8. Lowry, O.H.; Rosembrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Clin.*, 193:265-275, 1951.
9. Nieto, A.; Coch, J.A.; Torres, J.M.; Yarzábal, L.A. - Aislamiento de抗ígenos cationicos de *Paracoccidioides brasiliensis* mediante intercambio iônico. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 54:435-437, 1974.
10. Scroferneker, M.L. - Contribuição para o estudo da composição antigenica do *Paracoccidioides brasiliensis*. Comparação entre 5 amostras. São Paulo, 1982. (Tese-Instituto de Ciências Biomédicas - USP).
11. Silva, M.E.; Kaplan, W. - Specific fluorescein-labeled antiglobulins for the yeast form of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. Inst. Trop. São Paulo*, 7:290-294, 1965.
12. Yarzábal, L.A.; Torres, J.M.; Josef, M.; Vigna, I.; da Luz, S.; Andrieu, S. - Antigenic mosaic of *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Pan American Symposium on

- Paracoccidioidomycosis, 1º Medellin 1971. Proceedings. Washington, PAHO, 1972, p.239-244. (Scient. Publ. n° 254).
- 13.Yarzábal, L.A.; Biguet, G.; Vaucelle, T.; Andrieu, S.; Torres, J.M.; da Luz, S. - Análisis immunoquímica de extractos solubles de *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 11:80-88, 1973.
- 14.Yarzábal, L.A.; Andrieu, S.; Bout, D.; Naquira, F. - Isolation of a specific antigen with alkaline phosphatase activity from soluble extracts of *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia*, 14:175-280, 1976.
- 15.Yarzábal, L.A.; Bout, D.; Naquira, F.; Fruyt, J.; Andrieu, S. - Identification and purification of the specific antigen of *Paracoccidioides brasiliensis* responsible for immunoelectrophoretic band E. *Sabouraudia* - 15:79-85, 1977.

OCORRÊNCIA DE FUNGOS EM MANTEIGAS OFERECIDAS AO CONSUMO PÚBLICO NO MUNICÍPIO DE SÃO PAULO

Claudete Rodrigues Paula

Walderez Gambale

Sebastião Timo Iaria

& Stelito A. Reis Filho

Recebido para publicação em 17/12/87

Deptº. de Microbiologia

Instituto de Ciências Biomédicas USP

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374

05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

O trabalho refere-se ao estudo da microbiota fúngica de manteiga vendida no município de São Paulo. Noventa e quatro por cento das amostras estudadas revelaram a presença de fungos, sendo que em 85% se detectou leveduras e em 46% bolores.

Candida famata (26%); *Rhodotorula glutinis* (18%); *Candida lipolytica* (12%); *Candida parapsilosis* (10%); *Candida diddensiae* (10%) e mais 13 diferentes espécies foram as leveduras encontradas. *Cladosporium* (18%); *Penicillium* (12%); *Geotrichum* (8%); *Aspergillus* (6%) e *Trichoderma* (6%) foram os gêneros de bolores identificados. Os resultados demonstram que os fungos ocorrem em alta frequência em manteigas, observando-se uma maior incidência de leveduras e uma grande variedade de gêneros e espécies.

Summary

Occurrence of fungi in butter available for public consumption in the city of São Paulo

In order to identify the fungi which part of the aerobic microbiota of dairy products, 50 samples of butter available for public consumption were analysed. Of these samples, 94% presented fungi colonies. *Candida famata* (26%); *Rhodotorula glutinis* (18%); *Candida lipolytica* (12%); *Candida parapsilosis* (10%); *Candida diddensiae* (10%) and more 14 different species of yeasts were isolated. *Cladosporium* (18%); *Penicillium* (12%); *Geotrichum* (8%); *Aspergillus* (6%) and *Trichoderma* (6%) were the genera of moulds identified.

These samples demonstrated that the fungi occurred in high frequency in butter presented bigger frequency of yeasts and large variety of genus and species.

Introdução

A manteiga é o produto comercial mais importante derivado do leite. Os microrganismos presentes nesse produto podem afetá-lo e a fim de se evitar problemas este alimento deve ser preparado a partir de creme de leite pasteurizado, empregando-se microrganismos selecionados (7).

Os alimentos com alto teor de gordura são mais sensíveis aos agentes químicos do que aos agentes microbianos, no entanto, certas bactérias e fungos são capazes deoccasionar rancidez como *Candida lipolytica* (2).

Do ponto de vista bacteriológico o número de bactérias do grupo coliforme é utilizado para se avaliar as condições sanitárias do produto. A qualidade de uma manteiga, por outro lado, pode ser verificada também a partir do estudo qualitativo e quantitativo de bolores e leveduras (5, 15).

Sob o aspecto de Saúde Pública deve-se salientar a possibilidade de transmissão de doenças através da ingestão de manteigas contaminadas com microrganismos patogênicos (9).

Com relação à identificação da microbiota fúngica da manteiga, raros são os trabalhos publicados. A maioria deles relata a contagem total de fungos neste produto, a descrição de *Candida lipolytica* como agente de rancificação ou o encontro casual de bolores que alteram a coloração do mesmo, tais como *Cladosporium*, *Penicillium* e *Aspergillus* (6, 8, 10).

Dante do exposto e devido a inexistência de dados taxonômicos mais precisos sobre a microbiota fúngica, o presente trabalho teve como objetivos verificar a presença de bolores e leveduras e a identificação destes microrganismos em manteigas oferecidas ao consumo público do Município de São Paulo.

Material e Métodos

Amostras analisadas - De vários supermercados do Município de São Paulo foram coletadas 50 amostras de manteiga, de marcas diferentes. As amostras eram colocadas em caixa de material isotérmico, contendo gelo, e transportadas ao laboratório onde eram mantidas sob refrigeração até o início das análises micológicas, cujo tempo não excedia de 2 horas.

Obtenção da gase aquosa e preparo das diluições - Cada amostra foi transferida assépticamente para frasco de boca larga, o qual era mantido em banho maria, até fusão total do material.

A manteiga fundida era centrifugada, a fase gordurosa desprezada e a fase aquosa separada.

À 1ml da fase aquosa foram adicionados 9ml de água fosfatada (pH 7,2), a fim de se obter uma diluição de 10^{-1} e a partir desta, realizaram-se diluições de 10^{-2} a 10^{-6} (18).

Isolamento e identificação das culturas - Cada diluição do material (1ml) foi colocado em placas de Petri e a seguir vertia-se 15ml de ágar batata acidificado. Após homogeneização e solidificação do material, as placas foram incubadas à 25°C por 5 a 10 dias (3).

Após este período escolhia-se as placas que permitiram o isolamento dos diversos tipos morfológicos, selecionados segundo cor, tamanho, consistência, bordos, brilho e topografia das colônias.

Os tipos morfológicamente representativos eram semeados em tubos contendo ágar Sabouraud-dextrose (Difco), incubados à 25°C e armazenados até posterior identificação.

O estudo taxonômico das leveduras seguiu os métodos preconizados por Lodder, 1970 e Kreger-van Rij, 1984, envolvendo aspectos morfológicos e fisiológicos. A identificação dos bolores foi realizada segundo Arx, 1970.

Resultados

Das 50 amostras de manteigas analisadas 94% apresentaram presença de fungos, havendo crescimento de bolores em 46% e de leveduras em 85%.

Nas Tabelas 1 e 2 encontram-se as frequências com que vários gêneros de bolores e vários gêneros e espécies de leveduras foram isolados a partir das amostras estudadas.

Tabela 1 -
Frequência de
diferentes gêneros
de fungos isolados
em amostras de
manteiga.

Fungos	Frequência
<i>Candida</i>	62%
<i>Cladosporium</i>	18%
<i>Rhodotorula</i>	18%
<i>Penicillium</i>	12%
<i>Geotrichum</i>	8%
<i>Aspergillus</i>	6%
<i>Cryptococcus</i>	6%
<i>Trichoderma</i>	6%
<i>Hansenula</i>	2%

Tabela 2 - Frequência de
diferentes espécies de
leveduras isoladas em amostras
de manteiga.

Espécie	Frequência
<i>Candida famata</i>	26%
<i>Rhodotorula glutinis</i>	18%
<i>Candida lipolytica</i>	12%
<i>Candida dildensiæ</i>	10%
<i>Candida parapsilosis</i>	10%
<i>Candida sp¹</i>	8%
<i>Candida haemulonii</i>	6%
<i>Candida kefyr</i>	6%
<i>Candida krusei</i>	6%
<i>Candida inconspicua</i>	4%
<i>Candida sp²</i>	4%
<i>Cryptococcus albidus</i>	4%
<i>Candida langeronii</i>	2%
<i>Candida globosa</i>	2%
<i>Candida solani</i>	2%
<i>Candida tenuis</i>	2%
<i>Cryptococcus unigutulatus</i>	2%
<i>Hansenula anomala</i>	2%

Discussão e Conclusões

Na presente investigação pode-se notar a alta frequência de fungos (94%) nas amostras estudadas, indicando a possibilidade de condições insatisfatórias de processamento ou de conservação do produto. Estes microrganismos podem ser oriundos de equipamentos e utensílios com limpeza inadequada, da matéria prima contaminada, de manipuladores (pele e mucosas), de água ou de exposição prolongada ao ar atmosférico. Foster em 1957 (7) assinalou que 99% dos bolores e leveduras presentes no creme de leite utilizado na fabricação da manteiga devem ser destruídos pela pasteurização. McDowell, em 1953 (14) constatou ainda a ausência de leveduras em manteigas de boa qualidade, fato que não ocorreu neste estudo.

Os gêneros de bolores encontrados já foram isolados de manteigas, alterando a cor do produto, assim como rancificando o mesmo (8). Exceção ao gênero *Trichoderma*, observado em 6% das amostras analisadas, e não descrito neste produto por outros autores (8, 10).

Jaym, em 1973 (10) descreveu a alta frequência, dos gêneros *Alternaria*, *Mucor* e *Rhizopus*, em manteigas, mas nesta pesquisa não se identificou tais fungos.

Com relação as leveduras isoladas, os gêneros *Candida* e *Rhodotorula* (Tabela 1) apresentaram as maiores frequências, seguidos de *Cryptococcus* e *Hansenula*, único gênero na fase ascosporada. As espécies de leveduras isoladas podem ser encontradas no ar, solo, água, alimentos, animais domésticos e no próprio homem (pele, unhas, mucosas, escarro), fazendo parte de sua microbiota normal ou transitória (1, 11, 13, 17).

O isolamento de *Candida lipolytica* (12%) coincidiu com os achados de outros autores, sendo a mesma reconhecida como ativo deteriorante de produtos lácteos, pela produção de lipase (6, 10). *C. lipolytica* também é descrita como agente de candidose ocular após traumatismo (16).

É interessante ressaltar ainda o isolamento de *C. parapsilosis* (10%); *C. krusei* (6%) e *C. kefyr* (6%), espécies até então não citadas em manteigas e classicamente descritas como leveduras de importância médica, ocasionando quadros de candidoses superficiais e profundas (12, 17).

A maioria das espécies isoladas são responsáveis pela oxidação e fermentação de várias fontes de carbono, podendo perfeitamente ocasionar a deterioração do produto (12).

A realização de outros estudos qualitativos e quantitativos se faz necessária nestes derivados do leite, para que se venha estabelecer novos padrões com relação a microbiota fúngica, sem prejuízos para o produto e/ou para a saúde pública.

Referências Bibliográficas

1. Al Doory, Y. - Laboratory medical mycology. Philadelphia, Lea & Febiger, 1980.
2. Alford, J.A. - Lipolytic microorganisms. In: Speck, M.L. - ed. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington, American Public Health Association, 1976. p.184-189.
3. American Public Health Association. Standard methods for the examination of dairy products 13. ed. Washington D.C., 1972.
4. Arx, J. Von - Fungi sporulating in pure cultures, London, J. Cramer, 1970.
5. Demeter, K.J. - Elementos de microbiología lactologica 6.ed. Zaragoza, Acribia, 1969.
6. Downes, T.E.H. - The lipolytic of butter by microorganisms, S. Afr. J. Agric. Sci., Pretoria, 2:527-541, 1959.
7. Foster, E.M. - Dairy microbiology. Englewood Cliffs, Prentice Hall, 1957.
8. Frasier, W.C. & Westhoff, D.C. - Food microbiology. New York, McGraw Hill, 1978.
9. Hobbs, B.C. - Food poisoning and food hygiene 3.ed. London, Edwards Arnold, 1976.
10. Jay, J.M. - Alteraciones de otros alimentos. In: Microbiología moderna de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1973.
11. Kreger-van Rij, N. - The yeasts. A taxonomic study. 3 ed. Elsevier, N. York, 1984.
12. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C. - Microbiología Médica. Fungos actinomicetos e algas de interesse médico. São Paulo, Sarvier, 1984.
13. Lodder, J. - The yeasts. A taxonomic study 2.ed. Amsterdam, North Holland, 1970.
14. McDowall, F.H. - The buttermakers manual. Wellington, New Zealand University Press, 1953. v.1.
15. Martin, C.R.A. - Milk and milk products. In: Pratical food inspection. 7.ed. London, H.K. Lewis, 1969. p.466-540.
16. Nitzulescu, V. & Niculescu, M. - Considérations sur trois cas de candidose oculaire à *Candida lipolytica*. Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol., 3:269-272, 1976.
17. Rippon, J.W. - Medical mycology. Philadelphia, Saunders, 1982.
18. Thatcher, F.S. & Clarck, D.S. - Analisis microbiológico de los alimentos. Zaragoza, Acribia, 1973.

CARACTERIZAÇÃO DA LIPASE SECRETADA POR *RHIZOPUS OLIGOSPORUS*

Ely Nahas
 & Luiz Carlos de Assis

Deptº de Microbiologia
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal
 UNESP
 14870 Jaboticabal SP, Brasil

Recebido para publicação em 23/12/87

Resumo

A lipase secretada no meio de cultura por *Rhizopus oligosporus* apresenta maior velocidade de hidrólise nos tempos iniciais da reação enzimática ou em concentrações menores de enzima. O efeito do pH da reação enzimática sobre a atividade lipolítica propicia uma curva com maior velocidade de hidrólise em valor de pH 8,5 e nitidamente descendente do lado alcalino do pH da reação. Sais minerais, como o cloreto de sódio e o cloreto de cálcio, adicionados à mistura de reação, aumentam a atividade lipolítica em cerca de 45% em média. Por sua vez, os sais biliares (taurocolato e desoxicócolato de sódio) ativam a enzima em 22-25% quando em concentrações baixas e inibem acentuadamente quando em concentrações altas. A enzima secretada no meio de cultura suplementado com extrato de farelo de soja, óleo de soja ou Tween 80 apresenta uma pequena atividade de esterase em níveis correspondentes à atividade de lipase.

Summary

Characterization of lipase secreted by Rhizopus oligosporus

The lipase secreted by *Rhizopus oligosporus* is most active during the initial times of reaction or low levels of enzyme solution in the reaction mixture. The lipase exerts its maximum effect at pH 8.5. CaCl_2 and NaCl exert an activating effect of about 45% on the enzyme. By the other hand, bile salts enhanced the lipolytic activity when in low concentration but depressed when in high concentration. The lipase of soybean meal extract, soybean oil and Tween 80 culture media has a small esterase activity corresponding to the levels of lipolytic activity.

Introdução

Resultados prévios deste laboratório (15) indicaram que a produção de lipase por *Rhizopus oligosporus* está sujeita ao controle pela fonte de carbono e de nitrogênio e bem como pelas condições de cultivo. No entanto, em *Penicillium chrysogenum*, foi demonstrado que a atividade lipolítica aumenta na mesma proporção em que aumenta a concentração da enzima (3), enquanto que as lipases de *P. oxalicum* e *Aspergillus flavus* são mais ativas em pH 5,0 (12). Vários trabalhos mencionam que a atividade lipolítica é afetada pela adição de sais minerais (3) ou biliares (23) ou os dois juntos (17) na mistura de reação. Devido as suas características proteolíticas (22) ou lipolíticas (21), *R. oligosporus* tem sido utilizado para fermentar soja para produzir "tempeh" (16). No entanto, considerando a importância desse fungo, poucos

estudos tem sido conduzidos para melhor caracterizar a sua atividade lipolítica.

O objetivo deste trabalho foi o de ampliar os conhecimentos sobre o fungo *Rhizopus oligosporus* com particular ênfase ao estudo dos fatores que influenciam a atividade lipolítica.

Material e Métodos

Inóculo - O fungo *Rhizopus oligosporus* Saito, NRRL 2710 foi utilizado neste estudo. Cultura estoque e o preparo do inóculo foram descritos anteriormente (15).

Cultivo em meio líquido - Para os cultivos em meio líquido foi utilizado o meio de Crocken & Nyc (4) com o pH ajustado para 6,0 e tendo como fonte de carbono Tween 80 a 0,5% (v/v). Em alguns ensaios, o Tween 80 foi substituído por óleo de soja a 0,5% (v/v) ou extrato de farelo de soja desengordurado a 30% (v/v), preparado conforme Iwai & Tsujisaka (9). O procedimento utilizado para os cultivos líquidos foi descrito previamente (15). Após 72 h de incubação, à temperatura de 30°C, as culturas foram filtradas através de papel de filtro Whatman nº 1, à vácuo, através de funil de Buchner, para retenção do micélio. O meio de cultura filtrado, após ter o pH corrigido para 8,5, foi utilizado nos ensaios enzimáticos. O crescimento do fungo foi quantificado em termos de peso seco. Para isso, após lavagem do micélio, foi seco em estufa a 98°C por 24 h.

Ensaios enzimáticos - A atividade lipolítica foi determinada com base no procedimento de Akhtar & Col. (1) com algumas modificações (15). Uma unidade de atividade lipolítica foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μ mol de ácido graxo livre por hora.

A atividade de esterase foi determinada de acordo com a técnica descrita por Egelrud & Olivecrona (6). O substrato consistiu de uma solução de p-nitrofenilacetato em tampão acetato 0,1M pH 5,0. A mistura de reação continha 2,0ml de substrato, 2,0ml de tampão TRIS/HCl 0,05M pH 8,5 e 1,0ml da solução de enzima. Após 10 min, à 30°C, a absorbância do íon p-nitrofenóxido foi medida em 400nm ($E = 16440 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Subtraindo o valor do controle (enzima inativada por fervura), obtinha-se a atividade de enzima. Uma unidade de atividade de esterase foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 μ mol de p-nitrofenol por hora.

Atividades específicas foram expressas como unidades por mg de peso seco de micélio.

Resultados

A Figura 1 resume os resultados de atividade enzimática em função do tempo de reação da enzima. O perfil da curva obtida demonstra uma maior velocidade de reação durante os primeiros 30 minutos, quando se alcançou cerca de 36% da atividade máxima, aqui considerada como a atividade medida aos 180 minutos de reação. A seguir, observou-se um decréscimo da velocidade de reação, com a curva obtida em função do tempo mostrando-se linear a partir dos 60 minutos até os 180 minutos de reação.

Em outro conjunto de ensaios, a atividade foi determinada para volumes de solução enzimática variando de 0,1 a 3,0ml. Como se observa na Figura 2, volumes inferiores a 1,0ml mostram valores superiores na velocidade de reação enzimática. Assim, adotando-se um valor de 100% para a atividade observada com 3,0ml de lipase, obteve-se uma atividade de, aproximadamente, 26% para 0,1ml, 46% para 0,3ml e 56% para 0,6ml. A partir de volumes superiores a 0,6ml e até 3,0ml verifica-se uma linearidade em função do volume da solução de enzima na mistura de reação, e uma redução na velocidade de hidrólise.

A influência do valor do pH da reação enzimática sobre a atividade lipolítica de *R. oligosporus* desenvolvido em meios de cultura suplementados com Tween 80 e com

Figura 1 - Influência do tempo de reação sobre a atividade lipolítica.

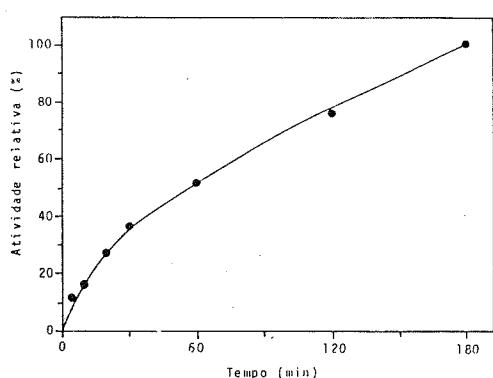


Figura 2 - Influência da concentração da enzima sobre a atividade lipolítica.

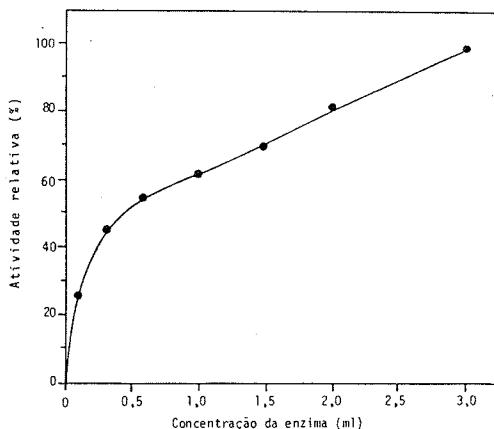


Figura 3 - Influência do pH da reação enzimática sobre a atividade lipolítica. Tampões: acetato 0,05 M pH 5,5; citrato 0,05 M pH 6,5; Tris-HCl 0,05 M pH 7,5 e 8,5; Glicina 0,05 M pH 9,0 e 10,0. Solução de enzima de meio de cultura suplementado com Tween 80 (-●-) ou extrato de farelo de soja (-○-).

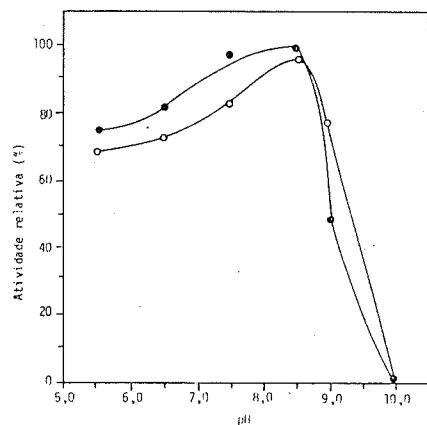
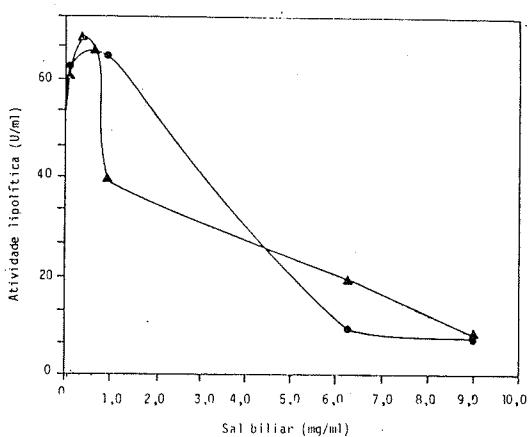


Figura 4 - Influência do desoxicólate de sódio e do taurocolato de sódio sobre a atividade lipolítica. Desoxicólate de sódio (-▲-) e taurocolato de sódio (-●-).



extrato de farelo de soja como fontes de carbono é mostrada na Figura 3. Os resultados demonstram que a enzima é relativamente ativa numa ampla faixa de pH, sendo completamente inativa em pH 10 e apresentando máxima atividade em pH 8,5.

Tendo por objetivo experimentar a influência de sais sobre a atividade lipolítica, foram, também, realizados ensaios com os sais minerais cloreto de cálcio e cloreto de sódio e com sais biliares desoxicólate e taurocolato de sódio. Na Tabela 1 estão relacionados os resultados obtidos com a adição das soluções de sais minerais à mistura de reação. Os valores médios para a lipase dos meios de cultura suplementados com Tween 80 e extrato de farelo de soja, demonstram que o CaCl_2 ativou a enzima de 40%, o NaCl de 50%, enquanto que a mistura dos dois sais propiciou um valor de 44% (em média).

Com relação à influência dos sais biliares (Figura 4), verificou-se que para concentrações menores do sal, isto é, da ordem de 0,63mg/ml e 0,90mg/ml a ativação da enzima alcançou os níveis de 125% e 122% (admitindo-se uma atividade enzimática de 100% para uma concentração nula do sal), respectivamente para o desoxicolato e taurocolato. Com o aumento da concentração do sal biliar, ocorreu redução gradual da atividade lipolítica. Desse modo, para uma concentração de 9mg/ml a atividade enzimática constatada foi da ordem de 14-16%.

Com o propósito de se verificar o efeito de diferentes fontes de carbono na atividade de esterase do meio de cultura inoculado com *R. oligosporus*, utilizou-se como substratos o p-nitrofenilacetato e a triacetina, dissolvidos em água. Com relação à triacetina (preparada em solução ou emulsão) não se constatou atividade enzimática. Com o p-nitrofenilacetato obteve-se os resultados discriminados na Tabela 2 que mostram uma atividade de esterase que decresceu do Tween 80 (100%) para o extrato de farelo de soja (81%) e deste para o óleo de soja (6 e 15%), utilizados como fontes de carbono no meio de cultura. Com relação ao óleo de soja, observou-se que culturas agitadas propiciaram 2,5 vezes maior atividade que culturas estacionárias (U/ml).

Tabela 1 - Efeito de sais minerais na atividade da lipase de *Rhizopus oligosporus*.

Adições	Atividade lipolítica			
	Tween 80 U/ml meio	%	Extrato farelo de soja U/ml meio	%
Controle	55,2	100	45,8	100
CaCl ₂ 0,2M	77,2	140	64,2	140
NaCl 2,0M	89,5	162	63,3	138
CaCl ₂ 0,2M + NaCl 2,0M	80,8	147	64,7	141

Tabela 2 - Efeito de diferentes fontes de carbono na atividade esterase de *R. oligosporus* (a).

Símbolos: a) As culturas foram incubadas em placas (estacionária) ou em erlenmeyers (sob agitação 110 oscilações/min, 6cm de amplitude).

Fonte de carbono	Atividade de esterase			
	U/ml meio	%	U/mg micelio	%
Tween 80 0,5% (estacionária)	1,56	100	1,89	100
Extrato de farelo de soja 30% (estacionária)	1,26	81	1,88	99
Óleo de soja 0,5% (estacionária)	0,09	6	0,23	12
Óleo de soja 0,5% (agitada)	0,23	15	0,12	6

Discussão

A relação não linear obtida entre a atividade lipolítica e o tempo de reação, e a concentração da enzima na mistura de reação encontra paralelo em algumas lipases de fungos (7, 12), de leveduras (19) e de bactérias (11). A maior velocidade de hidrólise é observada nos tempos iniciais de reação ou concentrações menores da enzima. A partir daí, a velocidade de reação vai decrescendo. Esses resultados podem sugerir que a menor velocidade de reação (Figuras 1 e 2) seja decorrente do acúmulo de proteases que seriam liberadas concomitantemente com as lipases desnaturando-as ou, ainda, a inibição pela concentração de produtos finais da reação ou de inibidores encontrados no meio de cultura (11, 20).

Os perfis das curvas apresentadas na Figura 3 mostram que a lipase de *R. oligosporus* apresenta maior atividade em pH 8,5 e uma queda maior do lado alcalino do pH ótimo do que do ácido. Resultados próximos aos encontrados neste fungo foram obtidos por Eitenmiller & Col. (7) que obtiveram um pH ótimo igual a 8,0 com a lipase do meio de cultura de crescimento de *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger*. Ainda nesse sentido, Kirsh (12) apresenta relatos de pH ótimo entre 8,5 e 9,3 para a lipase de *Aspergillus oryzae*. Valores de pH ótimo entre 8,5 e 9,5 foram também obtidos por Jonsson & Snygg (10) e Mencher & Alford (14) em diversas bactérias. Outros fungos e bactérias apresentaram valores de pH ótimo variando entre 5,0 a 7,8 (3, 12, 19). É provável que alguns fatores como substrato, tampão,

tempo e temperatura de reação possam ter conduzido a resultados tão diversos como os observados na literatura.

Em *R. oligosporus*, tanto o CaCl_2 como o NaCl , quando introduzidos na mistura de reação, propiciaram uma ativação lipolítica. É possível que essa ativação seja ou o resultado da remoção de ácidos graxos na mistura de reação pela formação de sais insolúveis, ou o favorecimento da estabilidade da enzima (18) ou, ainda, a manutenção da força iônica (3). Confirmando os resultados aqui obtidos, Shipe (20) verificou um aumento da atividade da lipase de *Penicillium roqueforti* e *Aspergillus niger* por efeito de CaCl_2 . Resultados semelhantes foram também obtidos por Chopra & Col. (3). Outros autores mencionam, porém, uma inibição enzimática pela adição desses sais no meio de cultura, empregando-se *Staphylococcus aureus* (13).

O efeito observado pelos sais biliares sobre a atividade lipolítica de *R. oligosporus*, isto é, uma pequena ativação de 22-25% para concentrações baixas dos sais e uma inibição para concentrações altas, coincide com o relato de Desnuelle (5). É provável que a reação de hidrólise ocorra desde que a enzima seja adsorvida por seu substrato emulsionado, sendo a velocidade inicial da reação uma função do número de moléculas de lipase adsorvidas na interfase (2). Dessa forma, os sais biliares atuariam como aceptores dos ácidos graxos quando em concentrações baixas e, quando em concentrações altas, exerceriam um efeito competitivo pelas micelas do lipídeo emulsionado (5). Observações semelhantes às encontradas neste trabalho foram feitas por Mates & Sudekavitz (13).

A atividade de esterase é caracterizada pela ação da enzima sobre o substrato solúvel em água, diferenciada da atividade de lipase em que o substrato, insolúvel em água, necessita ser emulsionado para a sua dispersão (5). Como em algumas enzimas microbianas têm sido constatadas essas duas atividades (8, 23), foram realizados ensaios com esse propósito, com a enzima de *R. oligosporus*.

Embora Hedström & Nilsson-Ehle (8) mencionem que não há relação convincente entre a atividade de lipase e a de esterase, os dados da Tabela 2 mostram, pelo menos, uma certa correspondência, entre a atividade de esterase com a atividade lipolítica. Dessa forma, verifica-se que em ambos os casos a atividade decresceu do Tween 80 para o extrato de farelo de soja e deste para o óleo de soja, quando empregados como fonte de carbono. Ainda mais, observou-se um aumento da atividade de esterase (U/ml de meio) da cultura estacionária (óleo de soja como fonte de carbono) em relação à cultura sob agitação e um decréscimo quando se considera a atividade em U/mg de micélio da mesma forma que a atividade lipolítica. Esses resultados sugerem que a lipase do meio de cultura de crescimento de *R. oligosporus* poderia apresentar atividade de esterase.

Agradecimentos

À FAPESP, pelo auxílio financeiro, e ao CNPq, pela bolsa de pesquisa.

Referências Bibliográficas

1. Akhtar, M.W.; Mirza, A.Q. & Chughtai, M.I.D. - Lipase induction in *Mucor hiemalis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40:257-263, 1980.
2. Benzonana, G. & Desnuelle, P. - Etude cinétique de l'action de la lipase pancréatique sur des triglycérides en émulsion. Essai d'une enzymologie em milieu hétérogène. *Biochim. Biophys. Acta*, 105:121-136, 1965.
3. Chopra, A.K.; Chander, H.; Batish, V.K. & Ranganathan, B. - Activité lipolytique de *Penicillium chrysogenum*. *Le Lait*, 60:184-191, 1980.
4. Crocken, B. & NYC, J.F. - Utilization of L- α -glycerophosphorylcholine a lecithin-deficient strain of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.*, 9:689-696, 1983.
5. Desnuelle, P. - The lipases. In: - Boyer, P.D. - The enzymes. New York, Academic, p.575-616, vol. VII, 1972.
6. Egelrud, T. & Olivecrona, T. - Purified bovine milk (lipoprotein) lipase: activity against lipid substrates in the absence of exogenous serum factors. *Biochim. Biophys. Acta*, 306:115-127, 1973.

7. Eitenmiller, R.R.; Vakil, J.R. & Shahani, K.M. - Production and properties of *Penicillium roqueforti* lipase. *J. Food Sci.*, 35:130-133, 1970.
8. Hedström, S.A. & Nilsson-Ehle, P. - Trioleoylglycerol lipolysis by *Staphylococcus aureus* strains from recurrent furunculosis, pyomyositis, impetigo and osteomyelitis. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.*, 91:169-173, 1983.
9. Iwai, M. & Tsujisaka, Y. - The purification and the properties of three kinds of lipases from *Rhizopus delemar*. *Agr. Biol. Chem.*, 38:1241-1247, 1974.
10. Jonsson, U. & Snygg, B.G. - Lipase production and activity as a function of incubation time, pH and temperature of four lipolytic micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.*, 37:571-581, 1974.
11. Khan, I.M.; Chandan, R.C.; Dill, C.W. & Shahani, K.M. - Production and properties of the extracellular lipase of *Achromobacter lipolyticum*. *J. Dairy Sci.*, 47:675, 1964.
12. Kirsh, D. - Factors influencing the activity of fungus lipase. *J. Biol. Chem.*, 108:421-430, 1935.
13. Mates, A. & Sudakevits, D. - Production of lipase by *Staphylococcus aureus* under various growth conditions. *J. Appl. Bacteriol.*, 36:219-226, 1973.
14. Mencher, J.R. & Alford, J.A. - Purification and characterization of the lipase of *P. fragi*. *J. Gen. Microbiol.*, 48:317-328, 1967.
15. Nahas, E. - Control of lipase production by *Rhizopus oligosporus* under various growth conditions. *J. Gen. Microbiol.*, 134:227-234, 1988.
16. Nahas, E. & Machado, J.O. - Estudos sobre a utilização de *Rhizopus oligosporus* em farelo de soja para produção de tempeh. *Científica*, 10:217-223, 1982.
17. Ogundero, V.W. - Lipase activities of thermophilic fungi from mouldy groundnuts in Nigeria. *Mycologia*, 72:118-126, 1980.
18. Ota, Y. & Yamada, K. - Lipase from *Candida paralipolytica*. Part III. - Further studies on the activation of the enzyme systems with bile or calcium salts. *Agr. Biol. Chem.*, 31:809-816, 1967.
19. Peters, I.I. & Nelson, F.E. - Factors influencing the production of lipase by *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.*, 55:581-591, 1948.
20. Shipe Jr., W.F. - A study of the relative specificity of lipases produced by *Penicillium roqueforti* and *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. Biophys.*, 30:165-179, 1951.
21. Wagenknecht, A.C.; Mattick, L.R.; Lewin, L.M.; Hand, D.B. & Steinkraus, K.H. - Changes in soybean lipids during tempeh fermentation. *J. Food. Sci.*, 26: 373-376, 1961.
22. Wang, H.L. & Hesseltine, C.W. - Studies on the extracellular proteolytic enzymes of *Rhizopus oligosporus*. *Can. J. Microbiol.*, 11:727-732, 1965.
23. Winkler, U.K. & Stuckmann, M. - Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. *J. Bacteriol.*, 138:663-670, 1979.

INCIDÊNCIA DE ROTAVÍRUS EM SUÍNOS NA REGIÃO DE CAMPINAS - SP

Maria Silvia Viccari Gatti
 Antonio Fernando Pestana de Castro
 Ireneu José Barsanti de Camargo
 & Natalicia Hifumi Hara

Recebido para publicação em 8/10/87

Deptº de Microbiologia e Imunologia
 Universidade Estadual de Campinas
 Instituto de Biologia - Cidade Universitária
 13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

Foi realizado um estudo preliminar na incidência de rotavírus em suínos na região de Campinas, SP. Noventa e duas amostras de fezes diarréicas foram coletadas durante o período de 1985 a 1986. As técnicas utilizadas para a detecção de rotavírus foram a imunoelétromico (IEM), ensaio imunoenzimático (EIE) e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Das 92 amostras estudadas, 18 (19,5%) foram positivas para rotavírus, em pelo menos dois dos testes utilizados. O teste de PAGE mostrou-se mais sensível que os outros dois métodos, uma vez que das 18 amostras positivas, 17 (94,4%) apresentaram um perfil eletroforético típico de rotavírus do grupo A. O EIE foi positivo para 14 amostras, sendo que uma delas não foi detectada em PAGE. Das 54 amostras analisadas em IEM, somente 11 amostras (20,3%) foram positivas, todas elas também diagnosticadas em PAGE e/ou EIE. Sendo assim, podemos concluir que no presente estudo, a técnica de PAGE foi mais sensível que os testes de EIE e IEM para a detecção de rotavírus em fezes suínas. A análise do perfil eletroforético das amostras mostrou que as mesmas apresentaram 5 tipos diferentes, sendo que em um deles foi possível a visualização de uma mistura de rotavírus do grupo A e do grupo C.

Summary

Incidence of porcine rotaviruses at region of Campinas, S.P., Brazil

A preliminary survey incidence of porcine rotaviruses in the region of Campinas, S.P., Brazil, was carried out. Ninety-two diarrheic stools were collected between 1985-1986. The technics used for rotaviruses detection were immuno-electromicroscopy (IEM), enzyme-immunoassay (EIE) and polyacrylamide gel eletrophoresis (PAGE).

Nineteen (19,5%) out of the 92 faecal samples were positive for rotaviruses in at least two of the methods evaluated. PAGE was more sensitive than the other two tests since among 18 samples positive in this test, 17 (94,4%) showed an electrophoretic pattern typical of group A of rotaviruses. The EIE assay was positive for 14 samples being one of them not detected by PAGE. Only 11 (20,3%) out of the 54 stools samples examined were positive in the IEM being all also positive by PAGE and/or EIE. Therefore according to the present investigation we can conclude that the PAGE method was more sensitive than EIE and IEM ones. As

Trabalho subsidiado pelo CNPq (Projeto nº 401702/84) e FAPESP.

Rev. Microbiol., São Paulo, 19(3):327-332, Jul./Set. 1988.

far as the detection of rotavirus in porcine diarrheic stools in concerned the analysis of the eletrophoretic patterns of rotavirus strains studied revealed that they could be grouped into 5 different types and in one of the samples it was possible to detected a mixture of rotaviruses belonging to groups A and C.

Introdução

Os rotavírus têm sido identificados como um dos principais agentes etiológicos de gastroenterites agudas tanto em crianças (2, 8, 15) como em várias espécies animais, tais como bovinos (13), aves, (9) e suínos (1, 11, 18). A maioria dos rotavírus presentes nos diferentes animais e no homem pode ser detectada através de técnicas sorológicas tais como ensaio imunoenzimático (EIE) (15), imunofluorescência (IF) (19), fixação de complemento (FC) (13) e imunomicroscopia (IEM) (15), por apresentarem um antígeno de grupo comum (13, 19). Estes mesmos rotavírus também podem ser detectados em eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), pela migração típica de seus 11 segmentos de RNA (12, 15). Mais recentemente, têm sido encontrados nos diferentes animais rotavírus atípicos, sem este antígeno comum (4, 18). Estes são indistinguíveis dos rotavírus do grupo A em microscopia eletrônica, mas têm sido classificados em outros grupos sorológicos diferentes (4, 20) onde cada um deles apresenta um padrão de migração diferente quando analisado em PAGE.

O presente trabalho tem por objetivo, além de avaliar as técnicas de IEM, PAGE e EIE na detecção de rotavírus de origem suína, na região de Campinas, S.P., analisar os tipos eletroforéticos encontrados.

Material e Métodos

Amostras de fezes - Foram coletadas de suínos com diarréia na região de Campinas, S.P., no período de março de 1985 a janeiro de 1986. Estas amostras foram divididas de acordo com a idade do animal. Assim 26 amostras (designadas A) eram provenientes de animais com diarréia neonatal (diarréia da 1^a semana), 18 amostras (designadas B) de animais com diarréia por volta do 15º dia (diarréia da 2^a semana) e 48 amostras (designadas C), obtidas de animais com diarréia após a 2^a semana até aproximadamente 60 dias de idade (diarréia do desmame). Depois da coleta, todas as amostras foram mantidas a 4°C até o preparo de extratos fecais a 10% em PBS pH 7,4 (2), que foram posteriormente estocados a -20°C. Os extratos assim obtidos foram utilizados nas três técnicas por nós avaliadas para o diagnóstico da rotavirose suína.

Ensaio imunoenzimático (EIE) - Este teste foi realizado com um "kit" da Fundação Oswaldo Cruz, R.J., gentilmente cedido pelo Dr. H.G. Pereira.

Imunoelétronicografia (IEM) - Para a realização deste teste foram seguidas as recomendações de Gaspar & Col. (5), com algumas modificações. Resumidamente, às telinhas foi adsorvido soro antirotavírus diluído a 1:1000 em PBS pH 6,8 por 5 minutos à temperatura ambiente. Depois de lavadas por 3 vezes no mesmo tampão, corou-se o material com acetato de uranila por 20 segundos. O material assim preparado foi observado ao microscópio eletrônico (Zeiss - M-9 com aumento de 27.000 vezes).

Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) - Foi realizada de acordo com as recomendações de Laemmli (10) com algumas modificações. Os extratos de RNA obtidos segundo Herring & Col. (7), foram analisados em gel de poliacrilamida a 7,0% após 18 horas de corrida a 10mA, à temperatura ambiente. O gel foi corado pela prata, segundo método de Sammons & Col. (17), modificado por Herring & Col. (7). A classificação utilizada para o estudo dos tipos eletroforéticos foi a de Lourenço & Col. (12) que consiste em dividir os 11 segmentos do RNA de rotavírus em 4 grupos

Tabela 1 - Correlação entre os testes de imunoelétricroscopia (IEM), ensaio imunoenzimático (EIE) e eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), para a detecção de rotavírus em fezes diarréicas de origem suína, na região de Campinas, S.P.

Símbolos: 1 = Lote A- Amostras de fezes diarréicas de suínos com até uma semana de idade (diarréia neonatal); 2 = Lote B- Amostras de fezes diarréicas de suínos com aproximadamente 15 dias de idade (diarréia da 2ª semana) e 3 = Lote C- Amostras de fezes diarréicas de suínos após a 2ª semana até 60 dias de idade.

	Número de amostras de fezes examinadas	Correlação entre os testes	PAGE ⁺ EIE ⁺				TOTAL
			PAGE ⁺ EIE ⁺	PAGE ⁺ EIE ⁻	PAGE ⁻ EIE ⁺	PAGE ⁻ EIE ⁻	
LOTE A ¹	26	IEM ⁺	3	0	0	0	3
		IEM ⁻	0	0	0	11	11
LOTE B ²	18	IEM ⁺	2	2	0	0	4
		IEM ⁻	2	1	0	14	17
LOTE C ³	48	IEM ⁺	3	0	1	0	4
		IEM ⁻	3	1	0	11	15
TOTAL	92	—	13	4	1	36	54

onde pequenas variações dentro de cada grupo pode significar tipos eletroforéticos diferentes, (diagrama da Figura 2) (11). A amostra de rotavírus SA 11 foi incluída como padrão em todos os testes estudados.

Resultados

Em 92 amostras de fezes diarréicas de origem suína, obtidas de animais entre 1 e aproximadamente 60 dias de idade, 18 amostras (19,56%) foram positivas para rotavírus, em pelo menos dois dos testes utilizados, ou seja IEM, EIE ou PAGE, conforme mostra a Tabela 1. Dentre as 18 amostras positivas, 17 (94,4%) foram

detectadas no teste de PAGE, 14 amostras (77,77%) foram positivas no EIE para rotavírus do grupo A, sendo que uma delas não foi detectada em PAGE e 7 outras positivas em PAGE não foram diagnosticadas em IEM. Das 54 amostras analisadas em IEM, somente 11 delas (20,37%) foram positivas. As duas amostras PAGE⁺ EIE⁻, assim como aquelas negativas na IEM mostraram um padrão eletroforético típico das amostras do grupo A de rotavírus. Entre todas as amostras positivas, 3 foram obtidas de animais com diarréia neonatal (lote A), 7 de animais com diarréia da 2ª semana (lote B) e 8 foram provenientes de animais com diarréia após a 2ª semana até aproximadamente 60 dias de idade (lote C). Entre as 17 amostras de fezes positivas para rotavírus no teste de PAGE, foram identificados 5 tipos eletroforéticos diferentes, pertencentes ao grupo A de rotavírus conforme mostra a Tabela 2. O tipo eletroforético mais freqüente foi designado Ia, IIb, IIIb, IVa, com 11 amostras, seguido do tipo Ib, IIc, IIIa, IVa com 3 amostras e dos tipos Ib, IIa, IIIc, IVa, Ia*, IIb*, IIIe, IVa e Ia*, IIb*, IIIb, IVa, com uma amostra cada. Este último tipo eletroforético corresponde à amostra indicada na Figura 1, linha 6, onde observam-se 13 segmentos no genoma viral. Há um segmento a mais no grupo 1 (Ia*) e

Tabela 2 - Tipos eletroforéticos de rotavírus encontrados em amostras de fezes diarréicas de suínos de 1 a 60 dias de idade na região de Campinas, SP., no período de março de 1985 a janeiro de 1986.

Símbolos:* = Os asteriscos correspondem a uma banda a mais nos grupos I e II, conforme mostra a Figura 1, linha 6.

AMOSTRAS	SOROGRUPO	Tipo eletroforético	Percentagem
CC(14), CT(5), 89A, 110B, 110B, 110A ₂ , 110B ₂ , 110C ₁ , 113X ₁ , 113B ₂ , 114B ₁	A	Ia, IIb, IIIb, IVa	64,70
GC(4), 65C, 80C	A	Ib, IIc, IIIa, IVa	17,64
110B ₂	A	IIb, IIa, IIIc, IVa	5,88
GC(10)	A	Ia, IIb, IIIe, IVa	5,88
84	A + C	Ia*, IIb*, IIIb, IVa	5,88

um terceiro segmento no grupo II (IIb*) o que é característico do grupo C de rotavírus. Esta amostra de fezes foi positiva nos 3 testes por nós utilizados na presente investigação, o que indica que havia na mesma uma mistura de partículas virais do grupo A e do grupo C.

Discussão

Os resultados apresentados neste trabalho vêm confirmar outros relatos da literatura, que demonstram uma alta sensibilidade de alguns testes para a detecção de rotavírus em fezes de animais (1, 11) e do homem (15). No nosso trabalho, vemos que tanto o EIE como o teste de PAGE são bastante sensíveis para o diagnóstico desta virose suína (Tab. 1). O teste de PAGE demonstrou ser ligeiramente superior ao EIE pois, dentre as 18 amostras detectadas como positivas, 17 delas foram reveladas neste teste enquanto que no EIE somente 14 amostras foram positivas. Todas as amostras positivas pertencem ao grupo A de rotavírus, uma vez que as 3 amostras PAGE⁺ EIE⁻ apresentaram um perfil eletroforético típico deste grupo de rotavírus (4). Uma explicação para o teste de IEM ter sido menos sensível que nos outros dois testes estudados pode ser devido ao fato das fezes diarréicas de origem suína serem, na maioria das vezes, abundantes em lipídios, o que dificulta a realização do teste de IEM. Para tentarmos contornar o obstáculo, tentamos utilizar o clorofórmio para a delipidação das fezes (3), mas mesmo assim, não obtivemos resultados satisfatórios (dados não apresentados). Outra justificativa é de que existiria nas fezes, de alguns animais estudados, um

Figura 1 - Tipos eletroforeticos em eletroforese em gel de poliacrilamida de rotavírus de origem suína detectados na região de Campinas - SP, e da amostra SA₁₁.

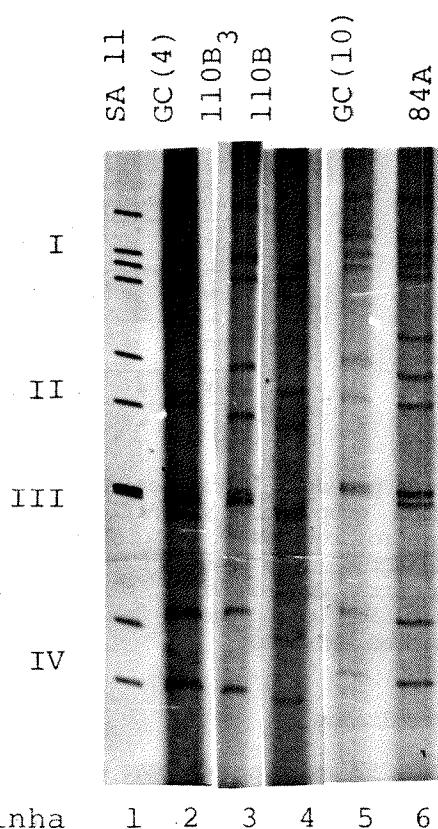
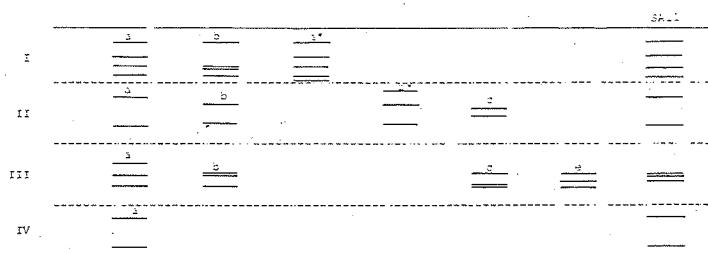


Figura 2 - Diagrama mostrando os diferentes padrões de migração dos 11 segmentos de RNA de rotavírus isolados na região de Campinas, SP, de suínos com diarréia conforme resultados obtidos na eletroforese em gel de poliacrilamida (Lourenço & Col. (12)). As diferenças de migração dentro de cada grupo (I a IV) são indicadas por letras minúsculas. Só estão representados os padrões encontrados entre as amostras analisadas e o padrão SA₁₁.



número muito pequeno de partículas virais, dificultando a sua visualização pela técnica de IEM, mas não impediria, contudo, a sua detecção por outros métodos, aparentemente mais sensíveis, como EIE e o PAGE. Diante dos nossos resultados, acreditamos ser o teste de PAGE o mais indicado para a caracterização de rotavírus como agente causal de gastroenterites agudas em suínos, pois além de sua sensibilidade relatada por outros autores (15) e comprovada por nós na presente investigação, este método permite a análise dos tipos eletroforéticos dos rotavírus. Foram detectados 5 tipos eletroforéticos diferentes entre as amostras estudadas com uma maior frequência do tipo Ia, IIb, IIIb, IVa (11 amostras) (Fig. 2). É interessante ressaltar que esse tipo prevaleceu entre as amostras isoladas no período de março a abril de 1985, entre animais dos lotes A e B ou seja, com diarréia neonatal e da segunda semana, que como se sabe, maiores prejuízos têm causado aos suinocultores. A demonstração de uma amostra com 13 segmentos no seu RNA (Fig. 1, linha 6) pode ser interpretada como devido a uma infecção simultânea por duas ou mais partículas virais ou ao aparecimento de recombinantes (12), isto porque, a amostra em questão (84 A) foi positiva nos 3 testes por nós utilizados. Provavelmente, há neste caso, a presença de rotavírus do grupo A ($IEM^+/- EIE^- PAGE^+$) e partículas virais do grupo C ($EIM^+/- EIE^- PAGE^+$), já que é possível a visualização de 3 bandas no grupo II, característico deste grupo de rotavirus (20). Observa-se também um 5º segmento no grupo I, o que pode confirmar a mistura de 2 tipos diferentes de rotavirus. Para uma confirmação deste resultado, seria necessário o cultivo da amostra em linhagens celulares, o que não foi possível de ser realizado, até o presente.

Sob o ponto de vista epidemiológico, nossos achados indicam ainda que, na região de Campinas, S.P. a alta incidência (19%) da rotavirose suína sugere ser esta enfermidade diarréica de leitões jovens tão ou mais importante que a colibacilose suína, que tem apresentado incidência semelhante (6, 16).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Dr. H.G. Pereira e seu grupo por todo apoio e orientação recebidos na realização do presente trabalho, realizado com apoio financeiro do CNPq e da FAPESP.

Referências Bibliográficas

- Bohl, E.H.; Kohler, E.M.; Saif, L.J.; Cross, R.F.; Agnes, A.G. & Theil, K.W. - Rotavirus as a cause of diarrhea in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 172:458-463, 1978.
- Candeias, J.A.N.; Rosemburg, C.P. & Rácz, M.L. - Identificação por contraimunoelétroforese de rotavírus em casos de diarréia infantil. *Rev. Saúde Pública, São Paulo*, 12:99-103, 1978.
- Estes, M.K.; Graham, D.Y.; & Gerba, C.P. - Rotavirus stability and inactivation, Britain, 4:403-409, 1979.
- Estes, M.K.; Graham, D.Y. & Diminov, D.H. - The molecular epidemiology of rotavirus gastroenteritis. *Prog. Med. Virol.* 29:1-22, 1984.
- Gasper, J.O.; Berian, L.O.S.; Oliveira, A.R. & Costa, A.S. - Serological identity of bean angular mosaic and cowpea mild mottle viruses. *Fitopatologia Brasileira*. 10:195-199, 1985.
- Gatti, M.S.V.; Serafim, M.B.; Pestana de Castro, A.F.; Brito, A.R.F. & de Barcellos, D.E.S.N. - Fatores de virulência em amostras de *Escherichia coli* enterotoxigênicas para suínos isoladas no Brasil. *Rev. Microbiol.* 16:21-30, 1985.
- Herring, A.J.; Inglis, N.F.; Ojeh, C.K.; Snodgrass, D.R. & Menzies, J.D. - Rapid diagnosis of rotavirus infection by direct detection of viral nucleic acid in silver-stained polyacrylamide gels. *J. Clin. Microbiol.* 16:473-477, 1982.
- Houly, C.A.P.; Uchoa, M.M.M.; Zaidan, A.M.E.; Gomes-Neto, A.; de Oliveira, F.M.; Athayde, M.A.C.; Almeida, M.F.L.M. & Pereira, H.G. - Electrophoretic study of

- the genome of human rotavirus from Maceió, Brazil., Brazilian J. Med. Biol. Res. 19:33-37, 1986.
- 9. Kang, S.Y.; Nagara, K.V. & Newman, J.A. - Rapid coagglutination test for detection of rotaviruses in turkeys. Avian Diseases 29:640-648, 1985.
 - 10. Laemmli, U.K. - Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227:680-685, 1970.
 - 11. Lecce, J.G.; Balsbaugh, R.K.; Clare, D.A. & King, M.W. - Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in wealing diarrhea of pigs. J. Clin. Microbiol. 16:715-723, 1982.
 - 12. Lourenço, M.H.; Nicolas, J.C.; Cohen, J.; Scherrer, R. & Briocut, F. - Study of human rotavirus genome by electrophoresis: attempt of classification among strains isolated in France. Annals of Virology, 132E:161-173, 1981.
 - 13. Matsuno, S.; Inoye, S. & Kono, R. - Antigenic relationship between human and bovine rotaviruses as determined by neutralization, immune adherence hemagglutination and complement fixation tests. Infect. Immun. 17:661-662, 1977.
 - 14. Pereira, H.G.; Leite, J.P.G.; Azevedo, R.S.; de Freitas, A. & Sutmoller, F. - An atypical rotavirus detected in a child with gastroenteritis in Rio de Janeiro, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 78:245-250, 1983.
 - 15. Pereira, H.G.; Azevedo, R.S.; Leite, J.P.G.; Barth, O.M.; Sutmoller, F.; de Freitas, V. & Vidal, M.N.P. - Comparison of polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) immunoelectromicroscopy (IEM) and enzyme immunoassay (EIA) for the rapid diagnosis of rotavirus infection in children. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 78:483-490, 1983.
 - 16. Pestana de Castro, A.F.; Serafim, M.B.; Brito, J.R.F.; de Barcellos, D.D.S.E. & Colli, I.A.G. - Virulence factors present in cultures of *Escherichia coli* isolated from pigs in the region of Concórdia, Santa Catarina, Brazil. Pesq. Vet., Bras. 4:109-114, 1984.
 - 17. Sammons, D.N.; Adams, L.D. & Mishikawa, E.E. - Ultrasensitive silverbase color staining of polypeptides in polyacrylamide gels. Electrophoresis 2:135-141, 1981.
 - 18. San Juan, C.S.; Bellinzoni, R.C.; Mattion, N.; La Torre, J. & Scodeller, E.A. - Incidence of group A and atypical rotaviruses in Brazilian pigs herds. Res. Vet. Sci. 41:270-272, 1986.
 - 19. Sato, K.; Inaba, Y.; Miura, Y.; Tokushisa, S. & Matumoto, M. - Antigenic relationship between rotaviruses from different species as studied by neutralization and imunofluorescence. Arch. Virol. 73:45-50, 1982.
 - 20. Snodgrass, D.R.; Herring, A.J.; Campbell, I.; Inglis, J.M. & Hargreaves, F.D. - Comparison of atypical rotaviruses from calves, piglets, lambs and man. J. Gen. Virol. 65:909-914, 1984.

LEUCOCYTE MIGRATION INHIBITION TEST (LMI) FOR THE IN VITRO DETECTION OF CELLULAR IMMUNITY IN NEWCASTLE DISEASE*

Antonio Carlos Paulillo
Aramis Augusto Pinto
Rosangela Zacarias Machado
& Sergio Nascimento Kronka

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Campus de Jaboticabal - UNESP (FCAVJ/UNESP)
Rodovia Carlos Tonanni, Km 5
14870 Jaboticabal SP, Brasil

Recebido para publicação em 29/10/87

Summary

The leucocyte migration inhibition (LMI) test described in the present paper proved to be appropriate for the evaluation of anti-Newcastle immunity in chicks. The hemagglutination inhibition (HI) test was used as a comparative parameter to measure the humoral immune response. The results showed that there is no relationship between cell immunity and humoral immunity.

Resumo

Teste de inibição da migração de leucócitos (IML) para detecção "in vitro" da imunidade celular na doença de Newcastle

O teste de inibição da migração de leucócitos (IML), descrito neste trabalho, mostrou-se apropriado para avaliação da imunidade anti-Newcastle em aves. O teste de inibição da hemagglutinação (HI) foi usado como parâmetro de comparação para medida da resposta imune humoral. Os resultados mostraram não haver correspondência entre as imunidades celular e humoral.

Introduction

The search for and titration of hemagglutination-inhibiting antibodies was the first humoral aspect studied in the immunological response to active immunization against Newcastle disease. However, the results reported in several experimental studies have been frequently controversial or inconclusive with respect to the participation of circulating antibodies in anti-Newcastle immunity (1, 3, 7, 8).

Other biological reactions such as local antibodies present in the respiratory and digestive systems and especially cell-mediated immunity should be considered with special attention in the evaluation of anti-Newcastle resistance. Some investigators (5, 10) have studied the role of cell-mediated immunity which is probably involved in the immunological response to vaccination against Newcastle disease. In view of these considerations, the present study was undertaken with the objective to correlate the titers of hemagglutination-inhibiting antibodies with the indices of blood leucocyte migration inhibition, as well as to correlate the latter indices with the values of total protection against challenge.

*This work was extracted from the Doctor Thesis of the first author.

Material and Methods

Experimental birds and handling - A total of 780 broiler-chicks of a commercial strain were used. Animals were distributed at random among 13 treatment groups with three replications (20 birds per parcel). During the experimental phase, the 13 groups were fed a commercial ration and submitted to identical routine aviculture management conditions.

Vaccines - We used live vaccines of the LaSota sample and inactivated oil vaccines coming from the same laboratory and consisting of a single lot of 10 vials each, all of them at the beginning of their period of validity.

Blood collection - A total of 156 blood samples were collected, corresponding to 20% of the birds in each group scheduled for challenge (69th day of life of the experimental birds).

The sera were inactivated at 56°C for 30 minutes to remove nonspecific hemagglutination inhibitors and placed in penicillin-like sterile vials and stored frozen at -20°C until the time of use.

Hemagglutination inhibition test - All serum samples obtained during the experimental phase were tested for hemagglutination-inhibiting (HI) antibodies with live antigens containing, 4 HA units, using the microtechnique of Cunningham (2).

Challenge - On the 70th day of the experiments, 20% of the chicks in each group were challenged with the "São João do Meriti" velogenic strain of the Newcastle disease virus (NDV). Half a milliliter of the viral suspension containing $10^{5.31}$ EID₅₀/0.1ml was administered intramuscularly following the recommendations of the National Research Council (6).

Resistance to the challenge is reported as percent total protection and refers to the absence of any clinical signs or of mortality among the animals challenged after vaccination in relation to control animals.

Test of blood leucocyte migration inhibition - We used the technique of Timms (9) and of Timms & Alexander (10), with some modifications. The antigen used was the NDV strain "São João do Meriti" itself, partially purified by adsorption and elution in chicken red blood cells (4) and applied at a concentration of 100 μ g/ml. The control antigen was normal allantoid fluid (NAF) from specific-pathogen-free (SPF) embryos incubated for eight to ten days.

Blood leucocyte cells were obtained by cardiac puncture from 50% of the animals in each group scheduled for challenge on the 69th day of life. A total of 30ml blood (10ml per replication) was obtained from each group using a heparinized syringe (Liquemine Roche, 50 IU/ml). Total and differential leucocyte counts were carried out in a Neubauer chamber and on smears stained by the method of Rosenfeld, respectively. Differential counts revealed a predominance of mononuclear cells. These cells were left to stand for 1 hour at room temperature and then prepared and resuspended in complete TC-199 medium containing 100 μ g/ml antigens prepared with NDV or NAF or containing no antigen, at a proportion of 10^7 cells/ml. The cell suspension was compacted in a polyethylene capillary tube with the aid of a

Vaccination and sampling - The experimental birds were distributed at random into 13 groups of 60 chicks each as follows.

Symbols: LSV = Live LaSota vaccine; OIV = Oil inactivated vaccine.

Group	Administration route	Vaccine	Age at vaccination (days)	Revaccination by the ocular route with LSV (days)
A	Ocular	LSV	1	
B	Subcutaneous	OIV	1	
C	Ocular + Subcutaneous	LSV + OIV	1	
D	Ocular	LSV	1	21
E	Subcutaneous	OIV	1	21
F	Ocular + Subcutaneous	LSV + OIV	1	21
G	Ocular	LSV	14	
H	Subcutaneous	OIV	14	
I	Ocular + Subcutaneous	LSV + OIV	14	
J	Ocular	LSV	21	
K	Subcutaneous	OIV	21	
L	Ocular + Subcutaneous	LSV + OIV	21	
T	Unvaccinated control group			

syringe. The capillary tube was attached to a special cell migration chamber using silicone grease and the chamber was filled with complete TC-199 medium with or without antigen at the concentration mentioned above. The cell migration chamber was then incubated in a moist chamber at 37°C for 14-16 hours. Leucocytes from non-immunized birds (control group) and from birds hyperimmune to NDV were used as negative and positive control, respectively. Only leucocyte migration inhibition indices (IMI) higher than 20% were considered to be significant in the present study.

Experimental design - The correlation of HI titers with IMI indices and of IMI indices with total protection against challenge was calculated by estimating the linear correlation coefficient (r), whose significance was tested by the t test.

Results and Discussion

The cell-mediated immunity in response to anti-NDV vaccination with both inactivated and live vaccines, reported in the present study as percentage migration or IMI indices, is described quantitatively in Tables 1 and 3. Cell immunity levels were measured on the 69th day of life in experimental birds.

Table 1 - Blood leucocyte migration in experimental birds (69th day of life) in the absence or presence of antigen prepared with NDV.

Symbols: NDV = Newcastle disease virus.

Group	% Migration	
	Without NDV antigen	With NDV antigen
A	100,00	103,23
B	100,00	92,62
C	100,00	85,17
D	100,00	90,07
E	100,00	81,73
F	100,00	84,69
G	100,00	92,92
H	100,00	60,99
I	100,00	61,26
J	100,00	91,99
K	100,00	75,67
L	100,00	76,25
T	100,00	120,28

Table 2 - Blood leucocyte migration in control experimental birds (69th day of age) in the absence or presence of antigen prepared with NDV or NAF.

Symbols: NDV = Newcastle disease virus; NAF = Normal allantoic fluid extracted from SPF chick embryos after 8 to 10 days of incubation; C- = Non-immunized birds (Controls); C+ = Hyperimmune birds.

Control	Antigen	% Migration	
		Without antigen	With antigen
C-	NDV	100,00	120,28
C+	NAF	100,00	121,30
C+	NDV	100,00	46,45

The blood leucocyte migration inhibition assay used in birds for the Newcastle system was fully as expected. Thus, the leucocytes of the experimental animals migrated well both in the absence and presence of 100 μ g/ml antigen prepared with NDV. In the latter case, migration oscillated between 81.73 and 103.23%, except for groups H, I, K and L, which showed migration values ranging from 60.99 to 76.25%, considered significant in the present assay (Table 1).

Table 2 shows percent leucocyte migration values for the control birds (69th day of life) in the absence or presence of 100 μ g/ml antigens prepared with NDV or NAF.

This result demonstrates the absence of cell immunity in the presence of antigen prepared with NAF since the leucocyte migration index for the positive control group was 121.30%, as compared to 100.00% for the positive control group incubated without antigen.

Percent leucocyte migration for the negative control group was higher in the presence of antigen prepared with NDV than in the absence of the antigen (120.28% versus 100.00%) (Table 2).

Blood leucocyte migration was significantly inhibited in the positive control group in the presence of antigen prepared with NDV, with a value of 46.45% (Table 2). The blood leucocytes of the positive control group migrated well in the absence of antigen prepared with NDV (Table 2). These results (Tables 1 and 2) also indicate that NDV (the velogenic neuroviscerotropic strain called "São João do Meriti") proved to be an appropriate antigen for the leucocyte migration inhibition test employed in the study of the anti-NDV cell response in immunized birds, by inducing the release of leucocyte migration inhibition factor by immune lymphocytes of avian origin.

Table 3 shows a comparative study of the IMI indices of experimental birds obtained on the day before challenge (69th day of life) and the percentages of total protection against challenge in the different treatments employed.

The linear correlation coefficient was 0.948 (significant by the t test at the 1% probability level) indicated the presence of a close correlation between cell immune response and total protection against challenge.

Analysis of Table 3 in terms of mean values shows that higher protection values corresponded to higher IMI indices as follows:

IMI%	Total protection
23,75 - 39,01	100,00
14,83 - 18,27	75,00
7,08 - 9,93	50,00
- 3,23	16,66
- 20,28	0,00

It should be pointed out that only the inhibition values considered significant in the present experiment ($> 20\%$), i.e. those for groups H, I, K and L, corresponded to 100% total protection against challenge. These results also clearly explain the fact that birds with low HI titers were resistant to challenge in the presence of the velogenic neuroviscerotropic Newcastle disease challenge.

Table 3 also shows a comparative analysis of IMI indices and mean HI titers obtained for the sera of experimental animals on the eve of the challenge (69th day of life). The linear correlation coefficient was 0.462 (nonsignificant by the t test), indicating no correlation between the serologic response and cell-mediated immunity in the present experiment. This result agrees with that reported by Timms & Alexander (10), who observed that there was no close correlation between IMI indices and HI titers, but disagrees with data reported by Moreau & Col. (5) who detected a relatively close parallelism of the cell response kinetics with the humoral response kinetics.

The degree of cell-mediated immunity measured by the IMI test has shown variation with bird age, type of vaccine utilized and number of vaccinations (10).

In the present study, even though the birds were all from the same batch they were immunized with different types of vaccine combined or not at different ages, justifying the lack of correspondence between the cellular and serologic responses.

Table 3 - Comparative study of mean HI titers with the IMI indices and of IMI indices with percent total protection against challenge with the velogenic neuroviscerotropic strain of Newcastle disease virus in broilers aged 70 days. Symbols: a = Day before challenge; b = Geometric mean (\log_2); c = Without titer.

Group	HI (a) MG (b)	IMI (a) (%)	Total protection against challenge (%)
A	- (c)	3,23	16,66
B	3,00	7,37	50,00
C	3,50	14,38	75,00
D	-	9,93	50,00
E	6,58	18,27	75,00
F	5,16	15,31	75,00
G	3,58	7,08	50,00
H	3,50	39,01	100,00
I	6,16	38,74	100,00
J	4,50	8,01	50,00
K	4,33	24,33	100,00
L	6,67	23,75	100,00
T	-	-20,28	0,00

Acknowledgements

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Proc. n° 302386-82/VT), Brasil for financial support.

References

1. Chulan, U.; Ibrahim Latif, A.; Mustaffa Babjee, A. & Sheikh-Omar, A.R. - Vaccination against Newcastle disease. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 14(3):177-184, 1982.
2. Cunningham, C.H. - *Virologia practica*. 6. ed. Zaragoza, Acribia, 1971.
3. Devos, A.; Viaene, N.; Maes, R.; Devriese, L. & Spanoghe, L. - Newcastle disease: effects of vaccines and vaccination techniques on haemagglutination-inhibition (HI) antibodies and clinical resistance. *Develop. Biol. Standard.*, 28:464-472, 1975.
4. Godoy, C.V.F. - Padronização da reação de fixação do complemento na caxumba, com os抗ígenos S e V, pela técnica de Wadsworth, Maltaner e Maltaner. São Paulo, Faculdade de Medicina da USP, 1969. (Tese de Livre Docência).
5. Moreau, Y.; Dubreuil, N. & Bouquet, J.F. - Apreciation de l'activite des vaccins huileux par les tests humoraux et cellulaires. *Develop. Biol. Standard.*, 51:35-42, 1982.
6. National Research Council. - Subcommittee on avian disease. Methods for examining poultry biologics and for identifying and quantifying avian pathogens. Washington, DC, National Academy of Sciences, 1971.
7. Owolodun, B.Y. & Ajiboye, E.A. - Newcastle diseases vaccines: a study of duration of immunity and properties of LaSota vaccine given in drinking water. *Br. Vet. J.*, 13:508-585, 1975.
8. Paulillo, A.C.; Pinto, A.A.; Ariki, J.; Berchieri Jr., A. & Toyoshima, T. - Avaliação comparativa entre diferentes métodos de administração de vacina preparada com a estirpe vacinal LaSota do vírus da doença de Newcastle. *Pesq. Vet. Bras.*, 2(3):113-119, 1982.
9. Timms, L. - Leucocyte migration inhibition as an indicator of cells mediated immunity in chickens. *Avian Pathol.*, 3:177-187, 1974.
10. Timms, L. & Alexander, D.J. - Cell-mediated immune response of chickens to Newcastle disease vaccines. *Avian Pathol.*, 6:51-59, 1977.

ATIVIDADE ANTIVIRÓTICA DE NAFTOQUINONAS. II - DERIVADOS 1,4-NAFTOQUINÔNICOS FRENTE A ENTEROVÍRUS*

Maria Helena do Carmo Lagrota
 Marcia Dutra Wigg
 Marta Gonçalves Matos dos Santos

Dept. de Virologia
 Instituto de Microbiologia UFRJ
 Caixa Postal 68040
 21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Antonio Ventura Pinto
 & Maria do Carmo F.R. Pinto

Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) UFRJ
 21944 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Recebido para publicação em 8/12/87

Resumo

Foram estudadas 15 substâncias de estrutura naftoquinônica obtidas de síntese química: a própria 1,4-naftoquinona sem substituintes, um derivado com um radical hidroxila na posição 2 e 13 derivados hidroxilados apresentando diferentes grupos metileno-amino na posição 3. As culturas de células foram protegidas com as drogas antes da titulação dos vírus (polio 1, Coxsackie B₄ e ECHO 19). Pela determinação do índice de inibição virótico (IIV) mostrou-se que o ECHO-vírus 19 foi o mais inibido. Dos 14 compostos testados, 3 deles mostraram um IIV significativo contra ECHO-vírus como segue: IIV de 1,75 para 2-HO-1,4-naftoquinina e 2-HO-3-(N-morfolil)-metyl-1,4-naftoquinona e IIV de 3,75 para 2-HO-3-N-benzil-N'(N-benzil-2-etilamina)-1,4-naftoquinona. Este último composto mostrou atividade virucida, em experiência paralela, significando que a droga afeta diretamente a partícula viral.

Summary

Antiviral activity of naphthoquinones. II - 1,4-naphthoquinones derivatives against enteroviruses

Fifteen substances obtained by chemical synthesis were studied, named 1,4-naphthoquinone without chemical radicals, one derivative with a hydroxyl radical in the position 2 and thirteen hydroxylated derivatives presenting different methylene amine groups in the position 3. The cell cultures were protected with the drugs before viral titration (polio 1, Coxsackie B₄ and ECHO 19). The determination of viral inhibition index (VII) showed that ECHO-virus type 19 was the only one inhibited. Out of fourteen compounds tested, three of them showed a significative VII against ECHO-virus as follows: VII of 1,75 to 2-HO-1,4-naphthoquinone and 2-HO-3-(N-morpholil)-methyl-1,4-naphthoquinone and

*Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia UFRJ, com recursos do Conselho de Ensino para Graduados, UFRJ, CNPq e FINEP. CEPG

VII of 3,75 to 2-HO-3-N-benzyl-N'-(N-benzyl-2-ethylamino)-1,4-naphthoquinone. The latter compound showed virucidal activity in a parallel experiment, which means that the drug affected directly viral particle.

Introdução

Compostos tais como, lapachol, α -lapachona, xiloidona, 4-hidroxi- α -lapachona, β -lapachona, entre outras naftoquinonas, são encontrados na natureza, muitos deles apresentando atividades biológicas distintas. Das citadas, com exceção da β -lapachona que é 1,2-naftoquinona, as demais pertencem ao grupo das 1,4-naftoquinonas.

O lapachol (2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil) 1,4-naftoquinona), substância obtida do extrato de cerne de plantas pertencentes à família Bignoniaceae, possui propriedade anti-cancerígena (12, 15, 17), antimicrobiana (1, 4, 11, 14) e antivirótica (9). Devido à atividade antivirótica do lapachol, foram estudados no Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Cítotóxicas (LEDAC) do Departamento de Virologia da UFRJ, 19 derivados resultantes de sua transformação química, frente a enterovírus, demonstrando que alguns derivados também exibem ação antivirótica (8).

Nos estudos realizados, in vitro, com o lapachol (9) e com seus derivados (8), não foi possível encontrar uma correlação entre a presença de radicais na estrutura 1,4-naftoquinona e a inibição dos vírus.

Com a finalidade de obter mais dados sobre a reatividade biológica da estrutura naftoquinônica, neste trabalho foram pesquisados outros compostos naftoquinônicos, diferentes daqueles derivados do lapachol. Foram estudados: a própria 1,4-naftoquinona, a 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lawsona) e 13 derivados aminados da lawsona também contra enterovírus (polio tipo 1, Coxsackie B4 e ECHO tipo 19).

Material e Métodos

Substâncias estudadas - As quinonas de número 1 e 2 foram obtidas comercialmente do Laboratório Aldrich (Tabela 1). As demais (Tabela 2) foram sintetizadas no Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NPPN-UFRJ) pela reação de Manich, a partir da lawsona, tratando este composto com formaldeído e a amina apropriada, em etanol, segundo o processo descrito por Leffler & Hathaway (10).

Vírus empregados - Poliovírus tipo 1 (PLS), Coxsackievírus do grupo B tipo 4 (Cox. B4) e ECHO-vírus tipo 19 (ECHO 19), todos procedentes do National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Maryland, USA.

Linhagem de células - Foi empregada cultura de células LIC-MK₂ crescida em meio mínimo essencial de Eagle (MEM), suplementado com 10% de soro bovino, 100 μ g/ml de estreptomicina 0,25 μ g/ml de fungizona e 100UI/ml de penicilina. As células foram cultivadas em microplacas descartáveis (2) e em tubos de ensaio 13 x 100mm.

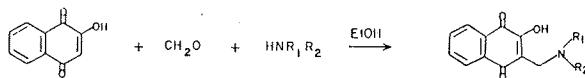
Determinação da citotoxicidade - As substâncias, após pesagem, foram solubilizadas

Tabela 1 - Naftoquinonas não aminadas, obtidas comercialmente*, para estudo da atividade antivirótica.
Símbolos: * = Substâncias obtidas do laboratório aldrich.

SUSTÂNCIA DE NÚMERO	FÓRMULA ESTRUTURAL	NOME QUÍMICO
1		1,4-naftoquinona
2		2-hidroxi-1,4-naftoquinona (lawsona)

Tabela 2 - Naftoquinonas aminadas sintetizadas a partir da lawsona para estudo da atividade antiviral.

Símbolos: * = Substância em forma de óleo.



SUBSTÂNCIA DE NÚMERO	FÓRMULA	NOME QUÍMICO	P. F. (°C)	RENDIMENTO %
3	R ₁ *R ₂ *-CH ₂ -CH=CH ₂	2-hidroxi-3-(N,N'-diethyl)aminometil-1,4-naftoquinona	136 - 140	58
4	R ₁ *R ₂ *-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	2-hidroxi-3-(N,N'-di-propil)aminometil-1,4-naftoquinona	143 - 145	55
5	R ₁ =H; R ₂ =CH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	2-hidroxi-(N-ciclo hexil)aminometil-1,4-naftoquinona	183 - 185	83
6	R ₁ =H; R ₂ =CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	2-hidroxi-3-(N-propil)aminometil-1,4-naftoquinona	238 - 240	15
7	R ₁ =R ₂ =CH(CH ₃) ₂	2-hidroxi-3-(N,N'-di-isopropil)aminometil-1,4-naftoquinona	240	52
8	R ₁ =H; R ₂ *	2-hidroxi-3-(N-desidrochiletíl)aminometil-1,4-naftoquinona	*	80
9	R ₁ *R ₂ =CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	2-hidroxi-3-(N-piperidil)metil-1,4-naftoquinona	196 - 200	90
10	R ₁ *R ₂ =-(CH ₂ -CH ₂) ₂ O	2-hidroxi-3-(N-morfolinil)metil-1,4-naftoquinona	184 - 186	88
11	R ₁ *R ₂ =CH ₂ -CH ₂ OH	2-hidroxi-3-(N,N'-2'-hidroxietil)aminometil-1,4-naftoquinona	180	68
12	R ₁ =R ₂ =-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂	2-hidroxi-3-(N-biciclo-azoo-2,2,3-octano)metil-1,4-naftoquinona	186	78
13	R ₁ =H; R ₂ =CH(CH ₃) ₂	2-hidroxi-3-(N-isopropil)aminometil-1,4-naftoquinona	158	45
14	R ₁ =H; R ₂ =C(CH ₃) ₂ (CH ₂ -OH)	2-hidroxi-3-(N-hidroxietac-butil)aminometil-1,4-naftoquinona	148 - 150	28
15	R ₁ =CH ₂ -	2-hidroxi-3-[N-benil-N,N-benil-2-oxotetrahydrofuranil]aminometil-1,4-naftoquinona	142	63

em pequeno volume de etanol e diluídas em MEM, sem soro bovino, de modo a obter uma concentração final de 160µg/ml. A concentração máxima não tóxica (CMNT), de cada droga, foi determinada colocando-a em contato com a monocamada celular, como descrito por Lagrota (5).

Determinação da atividade antivirótica - Esta atividade foi avaliada por redução no título de vírus (TCD₅₀) e determinação do índice de inibição virótico (IIV), segundo trabalhos anteriores (5, 6, 7). Os vírus foram titulados em cultura de células, pelo método de Reed & Muench (16) e o IIV foi obtido usando a seguinte fórmula:

IIV = Título de vírus em cultura de células sem substância - Título do vírus em cultura de células com substância

O IIV foi calculado em log do TCD₅₀ e considerado como significativo quando igual ou maior que 1,7 (5).

Determinação da atividade virucida - Foi empregado o método descrito por Sidwell & Huffman (18), com algumas modificações.

Os vírus, em diluições seriadas, após misturados com as substâncias na CMNT e que apresentaram atividade antivirótica, foram incubados a 37°C por 60 minutos. Cada diluição foi inoculada (0,1ml) em tubos de cultura de células, fazendo-se paralelamente controle do vírus (vírus e MEM). Após incubação a 37°C durante 72 horas, o título do vírus foi calculado (16). Foi considerada atividade virucida das substâncias quando foi obtida a redução de 2,0 log no título do vírus comparando com o controle.

Resultados e Discussão

A concentração máxima não tóxica (CMNT), determinada pelo contato de várias concentrações da substância com a monocamada celular, está registrada na Tabela 3. A maior concentração possível de ser empregada foi 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para as substâncias de número 4, 5, 6, 8, 9, 13, 14 e 15. A CMNT das substâncias 1, 3, 10, 11 e 12 foi 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e a da substância 2 foi 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. A substância de número 7 não foi estudada porque apresentou-se insolúvel no solvente empregado.

Os índices de inibição vírótico (IIV) das naftoquinonas em relação aos enterovírus, estão listados na Tabela 3. Entre as naftoquinonas estudadas, apenas as de número 2, (2-HO-1,4-naftoquinona), 10, (2-HO-3-(N-morfolil)metil-1,4-naftoquinona), 15, (2-HO-3-N-benzil-N'(N-benzil-2-etilamina)-1,4-naftoquinona), apresentaram atividade antivirótica para os vírus ECHO-19, com IIV acima de 1,7. Quanto ao pólio 1 e Coxsackie B₄, nenhuma das naftoquinonas estudadas apresentou índice de inibição vírótico significativo (maior ou igual 1,7). Das três naftoquinonas que apresentaram atividade antivirótica, somente a de número 15 apresentou capacidade virucida, ou seja, agiu diretamente sobre o vírus. Entretanto, apesar de seu alto IIV (3,75) não servirá para provável emprego clínico, pois devido à sua ação virucida este tipo de atividade é mais interessante no estudo de desinfetantes. No entanto, como se trata de um estudo de triagem, esta avaliação é pertinente e útil.

A substância de número 2 (lawsona) e a de número 10 inibiram o ECHO 19 com IIV igual a 1,75, mas não apresentaram atividade virucida.

Estudos realizados por outros pesquisadores demonstraram que a lawsona atua em tumores de camundongos inibindo o sarcoma 180 e age também em bactérias gram positivas (11). Em relação a estes tipos de bactérias o lapachol atua da mesma forma que a lawsona, sendo porém mais eficaz. Isto leva a crer que a cadeia lateral

isopentenil da molécula do lapachol parece ser importante neste sistema (13). Com relação aos enterovírus, estas duas naftoquinonas apresentaram atividade diferente, o lapachol inibiu o poliovírus tipo 1 (9) enquanto que a lawsona não inibiu, porém mostrou atividade antivirótica para o ECHO-vírus tipo 19. Para estes vírus, parece que a presença da cadeia lateral isopentenil não influencia a eficácia da atividade, vez que a inibição se deu sobre vírus diferentes.

A substância de número 10 (2-HO-3-(N-morfolil)-metil-1,4-naftoquinona, também apresentou atividade para ECHO-vírus, com um IIV igual a 1,75. Comparando os resultados do presente trabalho com os de outros pesquisadores, verifica-se que esta substância que inibe vírus, é inativa para o *Plasmodium lophurae* (3), enquanto que a 2-HO-3-(N-piperidil)-metil-1,4-naftoquinona (substância de número 9), embora não apresentando atividade antivirótica, foi ativa sobre esse microrganismo.

Pode-se observar, neste trabalho, que a 1,4-naftoquinona não apresentou atividade para os enterovírus (poliovírus, Coxsackie B₄ e ECHO 19), porém quando uma hidroxila foi introduzida na posição 2 o composto resultante (lawsona) inibiu o vírus ECHO. Quando sobre esta estrutura hidroxilada, radicais aminados foram adicionados à posição 3, observou-se que poucas variações puderam ser feitas, sem que houvesse perda ou diminuição da atividade. Esta observação confirma aquela feita por Fieser & Richardson (3) em relação ao *P. lophurae*. Para melhor elucidar tais suposições, estas naftoquinonas serão estudadas, juntamente com os derivados do lapachol, frente a outros vírus que tenham sido testados para o lapachol.

Tabela 3 - Índice de inibição viral (IIV) dos derivados naftoquinônicos frente aos enterovírus.

Símbolos: * = Concentração máxima não tóxica para as células LLC-MK₂; ** = Expressão log de TCD50.

Substância de Número	CMNT* ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	P ₁ S	Cox. B ₄	ECHO 19
1	20	0,92**	1,00	0,50
2	10	0,45	1,00	1,75
3	20	0,45	0,80	1,50
4	40	0,30	0,00	1,55
5	40	1,00	0,25	0,70
6	40	0,85	0,00	1,20
8	40	0,00	0,00	0,75
9	40	0,35	0,00	0,75
10	20	0,00	1,00	1,75
11	20	0,00	0,00	1,50
12	20	0,75	0,85	0,00
13	40	0,90	0,00	1,00
14	40	1,00	1,00	1,35
15	40	0,30	0,00	3,75

Referências Bibliográficas

1. Boveris, A.; Stoppani, A.O.M.; Do Campo, R. & Cruz, F.S. - Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61:327-329, 1978.
2. Brito, M.A.V.P.; Lagrota, M.H.C. & Machado, R.D. - Emprego de microtécnica na triagem de substâncias antivirais. *Rev. Microbiol.*, 12:65-69, 1981.
3. Fieser, L.F. & Richardson, A.P. - Naphthoquinone antimalarials. II - Correlation of structure and activity against *P. lophurae* in ducks. *J. Amer. Chem. Soc.*, 70:3156-3165, 1948.
4. Gonçalves, A.M.; Vasconcelos, M.E.; Do Campo, R.; Cruz, F.S.; Souza, W. & Leon, W. - Evaluation of the toxicity of 3-aryl-β-lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 1:167-176, 1980.
5. Lagrota, M.H.C. - Atividade antiviral in vitro de substâncias sintéticas e naturais. Rio de Janeiro. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978 (Tese de Mestrado).
6. Lagrota, M.H.C.; Freire, R.B.; Pereira, N.A.; Guimarães, J.C. & Wigg, M.D. - In vitro antiviral effects of synthetic compounds upon DNA and RNA viruses. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 26:331-334, 1984.
7. Lagrota, M.H.C.; Guimarães, J.C.; Pereira, N.A.; Wigg, M.D. & Fonseca, M.E.F. - Antiviral chemotherapy: action in vitro of ribavirin upon DNA and RNA viruses. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 24:121-124, 1982.
8. Lagrota, M.H.C.; Wigg, M.D.; Aguiar, A.N.S.; Pinto, A.V. & Pinto, M.C.F.R. - Antiviral activity of naphthoquinones. I - lapachol derivatives against enterovirus. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 29:15-20, 1987.
9. Lagrota, M.H.C.; Wigg, M.D.; Pereira, L.O.B.; Fonseca, M.E.F.; Pereira, N.A. & Guimarães, J.C. - Atividade antivirótica do lapachol. *Rev. Microbiol.*, 14:21-26, 1983.
10. Leffler, M.T. & Hathaway, R.J. - Naphthoquinone antimalarials. XIII - 2-hydroxy-3-substituted aminomethyl derivatives by the Mannich reaction. *J. Amer. Chem. Soc.*, 70:3222-3223, 1948.
11. Lima, O.G.; Coelho, J.S.B.; d'Albuquerque, I.L.; Mello, J.F.; Martins, D.G.; Lacerda, A.L. & Souza, M.A.M. - Substâncias antimicrobianas de plantas superiores. *Rev. Inst. Antib. (Recife)*, 11:21-26, 1971.
12. Linardi, M.C.F.; Oliveira, M.M. & Sampaio, M.R.P. - A lapachol derivative against mouse lymphocytic leukemia P-388. *J. Med. Chem.*, 18:1153-1161, 1975.
13. Nascimento, J.P. - Avaliação in vitro e in vivo da toxicidade de derivados 1, 2 e 1, 4-naftoquinônicos sobre *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978 (Tese de Mestrado).
14. Pinto, A.V.: Pinto, M.C.R. & Gilberto, B. - Schistosimiasis mansoni: blockage of cercarial skin penetration by chemical agents. I - Naphthoquinone and derivatives. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.*, 71:133-135, 1977.
15. Rao, K.V.; McBride, T.J. & Oleson, J.J. - Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor agent. *Cancer Res.*, 28:1952-1954, 1968.
16. Reed, L.D. & Muench, H. - A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 87:493-497, 1938.
17. Santana, C.F.; Lima, O.G.; d'Albuquerque, I.L.; Lacerda, A.L. & Martins, D.G. - Observação sobre as propriedades antitumoriais e toxicológicas do estrato do liber e de alguns componentes de cerne de pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*). *Rev. Inst. Antib. (Recife)*, 8:89-93, 1968.
18. Sidwell, R.W. & Huffman, J.H. - Use of disposable microtissue cultures plates for antiviral and interferon induction studies. *Appl. Microbiol.*, 22:797-801, 1971.

Errata

A new medium for the detection and enumeration of *Bacillus cereus* in food. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 18(4), p.330-334, 1987.

pag.331. ONDE SE LÊ: The formula in grams/liter is as follows: Trypticase (BBL) or Tryptone (Difco) or similar casein-peptone - 1.0; Methylene blue (George T. Gurr) - 5×10^{-3} ; D(+) Glucose (Reagen) - 0.2; NaCl (Reagen) - 3.0; Na₂HPO₄ (J.T. Baker) - 7 $\times 10^{-2}$; MgSO₄.7H₂O (Reagen) - 2×10^{-2} ; ZnSO₄.7H₂O (J.T. Baker) - 5 $\times 10^{-3}$ and Agar (Difco) - 1.8×10^1 - pH is adjusted to 7,9 with NaOH prior to autoclaving (1atm- 20 min.).

LEIA-SE: The formula in grams% is as follows: Trypticase (BBL) or Tryptone (Difco) or similar casein-peptone - 1.0; Methylene blue (George T. Gurr) - $0,5 \times 10^{-3}$; D(+) Glucose (Reagen) - 0.2; NaCl (Reagen) - 3.0; Na₂HPO₄ (J.T. Baker) - 7 $\times 10^{-2}$; MgSO₄.7H₂O (Reagen) - 2×10^{-2} ; ZnSO₄.7H₂O (J.T. Baker) - 5 $\times 10^{-3}$ and Agar (Difco) - $1,8 \times 10^1$ - pH is adjusted to 7,9 with NaOH prior to autoclaving (1atm- 20 min.).

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia.

O Centro Brasileiro-Argentino de Biotecnologia promoverá durante o decorrer 1989 os seguintes cursos:

1-) Enzimas Imobilizadas.

Período: 9 a 27 de janeiro 1989

Local: Univ. Estadual de Maringá-Maringá, PR, Brasil.

Responsável: Prof. Dr. Flávio F. de Moraes

Profª Gisella M. Zanin

Vagas: Brasileiras (6) - Argentinas (4)

2-) Técnicas de Biologia Molecular para a identificação e caracterização de vírus de interesse agropecuário.

Período: 6 a 17 de março de 1989

Local: INTA-CASTELAR - Argentino.

Responsável: Dr. H.E. Hopp

Vagas: Brasileiras (4) - Argentinas (6)

3-) Cultivo de Células e de Tecidos Vegetais.

Período: 20 de fevereiro a 31 de março 1989

Local: Instituto Agronômico do Paraná-Paraná PR, Brasil.

Responsável: Dr. Luiz Fernando de A. Kalinowski

Vagas: Brasileiras (9) - Argentinas (6)

4-) Tratamento biológico de resíduos orgânicos líquidos.

Período: 6 a 17 de março 1989

Local: IPT - São Paulo SP, Brasil.

Responsável: Hugo Moreira Soares

Vagas: Brasileiras (12) - Argentinas (8)

Informações e Inscrições:

Centro Brasileiro Argentino de Biotecnologia

Av. W/3 Norte - Quadra 513 - Bloco D

Edif. Imperador, 3º andar

Telex: 613938 MCT

Tel. (061) 273-1028/7117 R.33

70760 Brasília DF

Eventos promovidos pela Sociedade Brasileira de Microbiologia 2º Semestre de 1988.

1-) II Encontro Nacional de Microbiologia Ambiental.

SBM, CIAMA e Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

13 a 16 de outubro

Hotel Majestic, Águas de Lindóia, SP.

Informações: SBM. Tel. (011) 813-9647.

2-) IV Simpósio Nacional de Microbiologia Clínica.

SBM, Instituto de Microbiologia da UFRJ

6 a 8 de novembro

Hotel Glória, Rio de Janeiro, RJ.

Informações: Inst. de Microbiologia UFRJ. Tel. (021) 260-4193.

3-) 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,
 Informações: Inst. Oswaldo Cruz. Tel. (021) 270-6565/280-8787 R.341

4-) III Simpósio sobre Microbiologia de Alimentos.
 SBM, Universidade Federal de Santa Catarina.
 23 a 27 de novembro
 Universidade Federal de Santa Catarina-Florianópolis, SC.
 Informações: Dr. Rubem de Abreu Machado. Tel. (0482) 33-4888/9357

Roth, J.A. (ed.) - "Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens" - American Society for Microbiology - Washington D.C. - 1988. U\$ 75.00.

O livro é o resultado do "International Symposium on virulence mechanisms of veterinary bacterial pathogens" ocorrido em 1987 em Ames, Iowa, Estados Unidos. Aparentemente o interesse seria somente veterinário. Mas é um assunto de grande importância também em medicina humana pois, muitos dos fenômenos de agressão bacteriana estudados em animais encontram correspondência estreita com o que ocorre no homem. Trata-se de um campo em franca evolução.

Os assuntos são divididos em 6 grandes Seções, contendo vários capítulos em cada uma.

A primeira Seção trata dos mecanismos bacterianos de aderência, colonização e invasão. O primeiro capítulo dessa Seção faz um apanhado dos mecanismos celulares e moleculares da infecção sobre mucosas em geral. Segue-se um capítulo sobre as bases genéticas e moleculares da aderência da *E. coli*. As enteroinvadivas mereceram um item à parte.

A resistência bacteriana aos mecanismos de defesa humoral e celular do hospedeiro é o conteúdo das duas Seções seguintes.

As toxinas bacterianas são assuntos da quarta Seção. Destaque-se um capítulo sobre as toxinas citocidas produzidas por bastonetes Gram negativos. A patogênese e as enterotoxinas da *E. coli* são discutidas em separado. Segue-se um capítulo sobre toxinas como fator de virulência nas bactérias Gram positivas como *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Listeria*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*. O último item dessa Seção trata dos aspectos fisiopatológicos da enterotoxina B estafilocócida em macacos.

Nas duas Seções restantes são abordadas as estratégias e os estudos necessários para entender e combater as doenças de origem bacteriana.

São 390 páginas com farta referência bibliográfica recente que certamente facilitará o estudo ou não do assunto a se utilizar e a compreender esses importantes aspectos da agressão-defesa nas infecções bacterianas. Pela extensão e pela forma didática dos temas apresentados o livro passa a ser obrigatório nas bibliotecas especializadas.

Paulo H. Yasuda
 Deptº de Microbiologia ICB/USP
 Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
 Cidade Universitária USP
 05508 São Paulo SP

Schook, Lawrence B., ed. - Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications. New York, Marcel Dekker, Inc., 316p. 1987.

Desde a descoberta e aplicação por Kohler and Milstein, do processo de hibridação de células linfoides para a produção de anticorpos monoclonais, sua importância nas Ciências Biomédicas se tornou inquestionável, principalmente no que se refere ao seu valor em diagnóstico e terapêutica.

A obra de Lawrence B. Schook, vem sem dúvida nenhuma cobrir uma lacuna em nosso meio científico, dos métodos de produção e aplicação dos anticorpos monoclonais. Desmistificou-se de vez, uma técnica que é de suma importância para o desenvolvimento técnico, científico e biotecnológico do nosso país.

O livro, pertencente ao volume nº 33 da "Immunology Series", é escrito por pesquisadores de grande experiência na área, procedentes de centros de pesquisa e Universidades renomadas dos Estados Unidos da América, Canadá e Japão.

A primeira parte do livro ensina as estratégias e técnicas para a seleção e manutenção de fusos celulares e clones, com capítulos específicos sobre a construção de hibridomas de células T de Humanos e de Murinos, bem como a produção de heterohibridomas associado a mieloma "Rato-Humano".

Na segunda parte, aborda-se os métodos de caracterização, purificação e modificação dos anticorpos monoclonais e outros produtos dos linfócitos. Nesta parte, estão incluídos capítulos relacionados a produção de anticorpos monoclonais em ascites de ratos; modificação de anticorpos monoclonais por enzimas, biotina e fluorocromos, além da produção e purificação de linfocinas e seus anticorpos monoclonais.

Finalmente a última explica os métodos de aplicação dos anticorpos monoclonais dentro do sistemas experimentais. Os capítulos contidos nesta parte, abordam temas de aplicação, como o uso de anticorpos monoclonais para triagem de bancos genômico e produtos de oncogene, bem como a utilização desses anticorpos em Imunocitoquímica e para a caracterização de抗ígenos de células humanas normais e Leucêmicas.

Em síntese, esta obra é indispensável não só para quem trabalha com anticorpos monoclonais, mas também para Microbiologistas, Imunologistas, Bioquímicos, Patologistas e Profissionais da Área Biomédicas que direta ou indiretamente estão envolvidos com métodos de diagnósticos, no qual os anticorpos monoclonais constituem uma ferramenta cada vez mais útil na resolução dos problemas destas áreas.

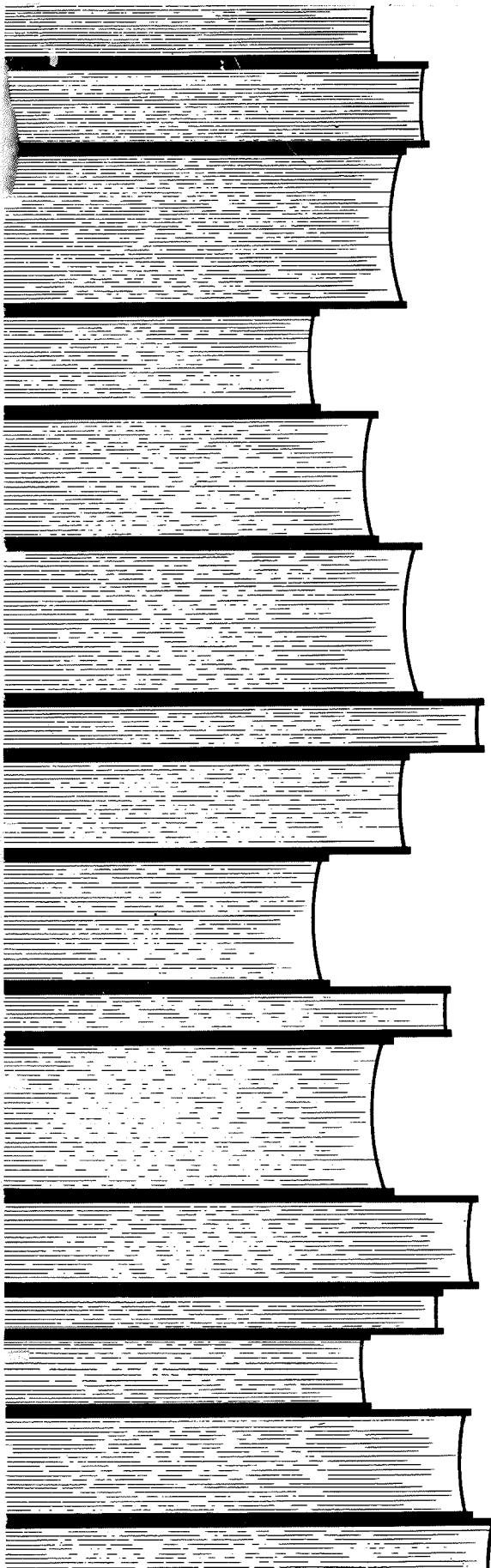
Edison Luiz Durigon
Deptº de Microbiologia ICB/USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP, Brasil

Impresso em offset



Rua Bogaert, 64
Vila Vermelha — São Paulo
Fone: 946-0233
CEP 04298

com filmes fornecidos pelo editor



**Através do
COMUT
você passa
a ter acesso
ao acervo
de
periódicos
das
principais
bibliotecas
do País.**

Informe-se sobre nosso
SISTEMA DE INTERCÂMBIO BIBLIOGRÁFICO

junto à Secretaria Executiva do COMUT:

Ministério da Educação e Cultura — Anexo I — 4º andar

Caixa Postal 07/1127 — CEP 70000 — Brasília — DF

Tel.: 226-4575 R. 805/806

Telex: (061) 2018 COPN

COMUT PROGRAMA
DE COMUTAÇÃO
BIBLIOGRÁFICA

