

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 19 Número 4 Out.-Dez. 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 nano (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 ($\mu l/litro/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas 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 seção correspondente.

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

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

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

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

MCT



CNPq



finep



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 : OUTUBRO-DEZEMBRO 1988 NÚMERO 4
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 19(4)

CONTEÚDO

CONTENTS

Crapez, M.A.C.; Tosta, Z.T.; & Lacerda, T.P.	347	Caracterização fenotípica de estíples de <i>Bacillus</i> <i>circulans</i> pertencentes a American type culture collection (ATCC)	Phenotypic characterization of <i>Bacillus circulans</i> of the american type culture collection (ATCC)
Leite, C.Q.F.; Giannini, M.J.S.M.; & Falcão D.P.	354	Presença de <i>Mycobacterium marinum</i> e outras micobactérias oportunistas em águas de piscinas em Araraquara, SP	Presence of <i>Mycobacterium marinum</i> and other opportunist mycobacteria in swimming pool waters in Araraquara, SP
Leal, N.C.; Cavalcanti, T.I.R.; Costa, M.F.da; Rodrigues, D.dos P.; & Hoier, E.	360	Avaliação de dois meios de transporte no isolamento de enterobactérias patogênicas	Comparison of some transport culture media for pathogenic enterobacteria
Barbosa, H.R.; & Carvalhal, M.L.C.	365	Isolamento e caracterização morfo-fisiológica de bactérias fixadoras de nitrogênio aeróbias, de vida livre, de solo de cerrado	Morfo-physiological aspects of free-living bacteria isolated from soil under cerrado
Nader Fº, A.; Rossi Jr, O.D.; & Schocken-Iturrino, R.P.	369	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigênicos em leite de vacas com mastite subclínica	Research of enterotoxigenic <i>Staphylococcus aureus</i> in milk from subclinic mastitic cows
Johnson, E.H.; Vidal, C.E.S.; & Rosa, J.S.	374	Comparação de uma difusão em Gel-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dig-ELISA) com o Ensaio de Inibição de Hemólise Sinergico para registrar a resposta humoral de caprinos a exotoxina de <i>Corynebacterium</i> <i>pseudotuberculosis</i>	Comparison of a diffusion in gel-enzyme linked immunosorbent assay (Dig-Elisa) and the synergistic hemolysis inhibition assay to record the antibody response of goats to the exotoxin of <i>Corynebacterium</i> <i>pseudotuberculosis</i>

Cunha, R.A.F.da; & Takei, K.	379	Mycoplasma hominis e Ureaplasma urealyticum: Pesquisa no material cervical de gestantes	Mycoplasma hominis and Ureaplasma urealyticum: research in pregnant cervical mucus specimens
Cardoso, C.L.; Teixeira, L.M.; Gontijo Fº, P.P.	385	Susceptibilidade a antimicrobianos e fagotipagem de amostras hospitalares e não hospitalares de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina, isoladas das mãos	Antimicrobial susceptibilities and phage typing of Hospital and non-hospital strains of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from hands
Sabioni, N.S.S.; Pinheiro, A.J.R.; & Teixeira, M.A.	393	Leite acidófilo: Isolamento e caracterização de <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros	Acidophilus Milk: Isolation and characterization of <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> from breast-fed children and from young calves feces
Genovez, M.E.; & Yasuda, P.H.	399	Avaliação da eficiência de estíples de <i>Leptospira biflexa</i> no diagnóstico sorológico de triagem da Leptospirose animal	Efficiency evaluation of <i>Leptospira</i> strains on screening serological diagnosis of the animal leptospirosis
Girio, R.J.S.; Mathias, L.A.; Yanaguila, R.M.; & Mano Fº, A.C.	406	Evolução dos títulos de anticorpos séricos em búfalos jovens infectados experimentalmente em <i>Leptospira interrogans</i> sorotipo pomona	Evolution of antibody titres in sera of young water buffaloes experimentally infected with <i>Leptospira</i> <i>interrogans</i> serovar pomona
Duarte, M. do R.	412	Resistência a antimicrobianos e produção de colicinas em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes	Drug resistance and colicin production in <i>Escherichia coli</i> isolated from urine and faeces
Campos-Takaki, G.M.de; & Beakes, G.W.	418	Condições culturais e desenvolvimento de <i>Ellisomyces anomalus</i>	Cultural conditions and development of <i>Ellisomyces anomalus</i>
Ashcar, H.; Paula, C.R.; & Petrocini, V.R.	422	Manutenção de fungos por processo de lyophilização após período prolongado de tempo - 34 anos	Maintenance of fungi by lyophilization (Observation after 34 years)
Lambais, M.R.	425	Descoloração microbiológica do efluente de uma indústria de celulose branqueada	Biodecolorization of the effluent of a bleached pulp plant

Leite, S.G.F.; França, F.P.de	430	Estudo preliminar do efeito da adição de etanol na fermentação alcoólica desenvolvida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F1	
Dias, J.L.C.; Coutinho, S.D.; Costa, E.O.da; Carvalho, V.M.da; Matushima, E.R.; Sinhorini, I.L.; & Gaviolle, M.C.	432	Surto de saprolegnose em girinos (<i>Rana catesbeiana</i>)	<i>Saprolegniosis outbreak in tadpoles (Rana catesbeiana)</i>
Goldman, G.H.; Fungaro, M.H.P.; & Azevedo, J.L.de	438	Avaliação da atividade celulótica de algumas linhagens do grupo <i>Aspergillus niger</i>	<i>The evaluation of the cellulolytic activit in some strains of Aspergillus niger group</i>
Shimizu, M.T.	442	Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero <i>Candida</i>	<i>Hystolitic enzymes produced by yeasts of genus Candida</i>
Maugeri F9, F.; & Goma, G.	446	Produção de proteína de organismos unicelulares a partir de ácidos orgânicos com <i>Candida utilis</i>	<i>SCP production from organic acids with Candida utilis</i>
Couceiro, J.N.dos S.S.; Machado, R.D.; Couceiro, E.dos S.S.; & Cabral, M.C.	453		<i>Study of an ornamental bird flock over a period of three years: Incidence of avian influenza viruses</i>
Informação Técnico-Científica SBM	460		

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE ESTIRPES DE *BACILLUS CIRCULANS* PERTENCENTES A AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION (ATCC)

Mirian A.C. Crapéz

Zilmar T. Tosta

& Teresinha P. Lacerda

Recebido para publicação em 2/10/86

Deptº de Biologia Celular e Molecular
Instituto de Biologia
Universidade Federal Fluminense
Caixa Postal 229
24000 Niterói RJ, Brasil

Resumo

Foram estudados aspectos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e nutricionais de seis estirpes nomeadas *B. circulans* pela ATCC. Sendo a estirpe 4513 o holótipo da espécie, foi possível caracterizar como pertencentes ao grupo ATCC 4515, 4516 e 9995. ATCC 4513 pertence ao grupo morfológico II, apresenta atividade para catalase, β -galactosidase e L-glutamato desidrogenase, hidrolisa o amido, o "Tween-80" e a composição do DNA é 37,3 moles% GC. Não utiliza ácidos tricarboxílicos, aminoácidos, amidas e compostos aromáticos. Cresce em NaCl 7% e acidifica meios de cultura contendo carboidratos. Em aerobiose, 87,8% dos carboidratos são utilizados como fonte de carbono. ATCC 4530 e 14176 não podem ser classificados como *B. circulans*. ATCC 4530 pertence ao grupo morfológico I. ATCC 14176 é aeróbica estrita, oxidase positiva e a composição do DNA é 51,0 moles% GC.

Summary

Phenotypic characterization of Bacillus circulans of the american type culture collection (ATCC)

Morphological, physiological, biochemical and nutritive aspects of six strains named *Bacillus circulans* by ATCC have been studied. Since strain 4513 is the holotype of this species, it has been possible to show that ATCC 4515, 4516 and 9995 belong to this group. ATCC 4513, a representant of morphologic group II, is endowed of catalase, galactosidase and L-glutamate dehydrogenase activities; it hydrolyses starch and Tween-80, and its DNA composition is of 37,3 moles% GC. ATCC 4513 does not use tricarboxylic acids, amino acids, amides nor aromatic compounds. It grows in 7% NaCl and acidifies carbohydrate containing culture media. In aerobic conditions, 87,8% of carbohydrates are used as carbon source. ATCC 14176 and 4530 cannot be classified as *B. circulans* since ATCC 4530 belongs to morphologic group I and since ATCC 14176 is strictly aerobic, showing oxidase activity and having a DNA composition of 51,0 moles% GC.

Introdução

As características estáveis e comuns a um grupo de estirpes microbianas servem Rev. Microbiol., São Paulo, 19 (4):347-353, Out./Dez. 1988.

para descrever, nomear e definir uma espécie. Outros grupos, à medida que aparecem, são examinados em suas propriedades morfológicas, fisiológicas, nutricionais e genéticas que persistem após o cultivo "in vitro" e são incorporados, pelas características comuns, às espécies já descritas. Dentre as diferentes estirpes definidas numa mesma espécie, uma delas, por apresentar um conjunto de características mais estáveis, conceitua o holótipo da espécie considerada.

As dificuldades na definição da espécie se tornam evidentes à medida que o espectro de características estudadas se amplia.

Os primeiros trabalhos sobre bacilos se basearam essencialmente nas características morfológicas. Mais tarde, a taxonomia deste gênero foi revista em função da análise das características bioquímicas e nutricionais e do número de estirpes estudadas. Em 1952, o gênero *Bacillus* foi dividido em três grupos morfológicos (18). A definição e a subdivisão interna deste grupo reposam exclusivamente nas características morfológicas. Baseado nesta classificação, estirpes de *Bacillus circulans* foram estudadas do ponto de vista morfológico, levando-se também em consideração alguns aspectos fisiológicos e bioquímicos (6). Este e outros trabalhos estabelecem a existência de uma grande heterogeneidade, tanto ao nível das características taxonômicas quanto da ultraestrutura das diversas estirpes de *Bacillus circulans* (20). Por outro lado, as variações importantes do teor de guanina e citosina do DNA reforçam a precariedade dos limites atribuídos a esta espécie (2).

Material e Métodos

Meio de cultura - O meio mineral abaixo foi utilizado para conservação e estudos das estirpes: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ - 3,575g; KH_2PO_4 - 0,98g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,03g; NH_4Cl - 0,5g; Solução de oligoelementos - 0,2ml e água destilada - 1000ml. A solução de oligoelementos foi preparada em água destilada com 0,5% de EDTA; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,2g; CaCl_2 - 5,54g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 5,6g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 4,79g; $\text{NH}_4\text{Mo}_7\text{O}_2_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 1,1g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 1,57g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 1,6g e água destilada - 1000ml, pH 6,0. As culturas são realizadas a 32°C.

Origem e conservação das estirpes - As estirpes foram cedidas por R.E. Gordon (Waksman Institute of Microbiology, New Jersey, Estados Unidos) e são originárias da American Type Culture Collection: ATCC 4513, 4515, 4516, 4530, 9995 e 14176. ATCC 4513 é a estirpe holótipo de *Bacillus circulans*. A conservação das estirpes foi feita em ágar nutritivo peptonado a 32°C.

Características morfológicas - As células e endosporos foram examinados ao microscópio óptico em contraste de fase; suas medidas foram obtidas pela inclusão em parafina. Os flagelos foram evidenciados pela técnica de Rhodes e o método de Gram foi realizado com bactérias em fase exponencial de crescimento (16).

Características fisiológicas, bioquímicas e nutricionais - Os testes realizados neste trabalho são clássicos e seguiram metodologia já descrita: catalase, reação de Voges-Proskauer, resistência e lisozima, produção de indol, de H_2 , de diidroxiacetona e de pigmentos em meios de cultura contendo glicose e tirosina, crescimento em anaerobiose, em NaCl 7% e NaN_3 , redução do nitrato, presença de L-fenilalanina-desaminase, de tirosinase e de hipericase, hidrólise do amido e da gelatina, temperatura máxima de crescimento (6), oxidase (10), inclusões de poli- β -hidroxibutirato (16), urease (18), hidrólise do "Tween-80" (7), β -galactosíde (11), arginina-diidrolase e nutrição carbonada (19), L-alanina e L-glutamato-desidrogenases (8), L-leucina-desidrogenase (14), acidificação dos meios de cultura contendo carboidratos em aerobiose (9), desnitrificação (20) e crescimento em meio peptonado anaeróbico em presença de $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$, $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ e N_2O (1).

Determinação do teor de guanina e citosina no DNA - A extração e purificação do DNA, bem como a determinação do seu teor em guanina e citosina foram realizados com metodologia já descrita (12, 17).

Resultados

As colônias em meio de cultura contendo agar nutritivo, são pequenas, lisas, convexas, transparentes e com bordas irregulares e/ou inteiras.

As células têm o aspecto de bastonetes, apresentam as extremidades arredondadas e geralmente formam cadeias (Tabela 1).

Tabela 1 - Gram, mobilidade, grupo morfológico, dimensões de células e endosporos, temperatura máxima de crescimento (TM) e teores do DNA em G + C expressos em moles %.

Estípites Características	ATCC 4513	ATCC 4515	ATCC 4516	ATCC 9995	ATCC 4530	ATCC 14176
Gram	positivo	negativo	variável	negativo	variável	variável
Mobilidade	positivo	positivo	negativo	positivo	positivo	positivo
Grupo morfológico	II	II	II	II	I	II
Células vegetativas (μm)	0,9 x 3,6 + 7,2	0,9 x 3,6 + 5,4	0,9 x 3,6 + 7,2	0,9 x 3,6 + 5,4	1,1 x 3,6 + 5,4	0,9 x 3,6 + 9
Endosporos (μm)	1,2 x 1,8	1,2 x 1,8	1,4 x 1,8	1,1 x 1,8	1,1 x 1,8	1,1 x 1,8
TM (°C)	48	48	48	37	49	39
G + C (moles %)	37,3	38,2	37,2	44,9	37,0	51,0

Os endosporos são ovais, terminais ou subterminais, deformando sensivelmente a célula, confirmado pertencerem ao grupo morfológico II (18). A estípita ATCC 4530 pertence ao grupo morfológico I (Tabela 1).

Não observamos a presença de cápsulas, indicando a ausência de exopolissacarídeos.

Todas as estípites são móveis e possuem flagelos peritíquios, exceto ATCC 4516 (Tabela 1).

A coloração de Gram é variável (ATCC 14176, 4516 e 4530), positiva (ATCC 4513) e negativa (ATCC 4515 e 9995).

Características fisiológicas e bioquímicas - Todas as estípites demonstram a presença de catalase, β-galactosidase, L-glutamato-desidrogenase, hidrolisam o amido, são auxotróficas e mesófilas.

Exceto a estípita ATCC 14176, aeróbica estrita, todas as outras são anaeróbicas facultativas, fermentam a glicose e acidificam meios de cultura contendo vários hidratos de carbono (Tabela 2). As estípites são incapazes de acidificar o meio contendo D-arabinose, D- e L-fucose e L-sorbose.

Somente a estípita ATCC 14176 é oxidase positiva, característica negativa para *Bacillus circulans* (1).

Apenas a estípita ATCC 9995 é resistente à lisozima, característica considerada variável na taxonomia deste grupo (6).

Tabela 2 - Acidificação do meio de cultura contendo hidratos de carbono.

Símbolos: + = Positivo; - = Negativo.

Hidratos de Carbono	Estípites ATCC 4513	ATCC 4515	ATCC 4516	ATCC 9995	ATCC 4530	ATCC 14176
Arbutina	+	+	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	-
D-Arabinol	+	+	+	-	+	-
Dulcitol	+	+	+	-	+	-
D-gluconato	+	+	+	+	+	-
D-sorbitol	+	+	+	+	+	-
D-trealose	+	+	+	+	+	-
Esculina	+	+	+	-	+	-
Galactose	+	+	+	+	+	-
Glicerol	+	+	+	+	+	-
Glicose	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	+	+	+	+	-
L-arabitol	+	+	+	+	+	-
L-arabinose	+	+	+	+	+	-
Fuculose	+	+	+	+	+	-
6-desoxi-L-manoze	+	+	+	-	+	-
Maltose	+	+	+	+	+	-
Manitol	+	+	+	+	+	-
Manose	+	+	+	+	+	-
Melezitose	+	+	+	+	+	-
Melibiose	+	+	+	+	+	-
α-metil-D-glucosídeo	+	-	+	+	+	-
Rafinose	+	+	+	+	+	-
Ribose	+	+	+	+	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+	-
Salicina	+	+	+	+	+	-
Xilose	+	+	+	+	+	-

Tabela 3 - Índice médio de utilização (IMU) dos substratos orgânicos como fonte de carbono

Substratos	Estirpes negativa(s)	IMU (%)
Amido, D-e L-arabinose, arbutina, D-glicose, D-galactose, D-gluconato, D-manoze, D-ribose, D-glicosamina, frutose, inulina, lactose, maltose, melibiose, rafinose, salicina, sacarose, trealose, ácido caprônico		100
Inosina, cellobiose, D-manitol	ATCC 14176	
2-ceto-D-gluconato, piruvato, D-arabitol, α -metyl-D-glucosídeo	ATCC 9995	83
D-glucoronato, D-xilose, D-melezitose	ATCC 4516	
L-malato, L-lactato, L-arabitol	ATCC 9995 e 14176	67
Fumarato	ATCC 4530, 9995 e 14176	
Glicerol	ATCC 4516, 4530 e 14176	50
D-sorbitol	ATCC 4515, 4516 e 14176	
L-ramnose	ATCC 4515, 4516, 9995 e 14176	
Glicerato	ATCC 4513, 4516, 4530 e 9995	33
D-galacturonato	ATCC 4513, 4515, 4516 e 4530	

As estirpes ATCC 4513, 4515 e 4516 crescem em presença de NaCl 7%.

O crescimento em presença de NaN₃ é observado nas estirpes ATCC 4513, 4530 e 9995.

A hidrólise do "Tween 80" é positiva para as estirpes ATCC 4513, 4516 e 9995.

As características abaixo são negativas para todas as estirpes: produção de indol e de pigmento em meio de cultura contendo glicose e tirosina, redução de NO₃⁻ em NO₂⁻ e N₂, reação de Voges-Proskauer, inclusões de poli- β -hidroxibutirato, produção de H₂ e de diidroxiacetona.

As estirpes não apresentaram atividade para as seguintes enzimas: urease, gelatinase, tirosinase, L-fenilalanina-desaminase, arginina-diidrolase, L-alanina e L-leucina-desidrogenases e hipuricase. Elas são incapazes de crescer em anaerobiose em presença de NO₃⁻, NO₂⁻, S₄O₆²⁻, S₂O₃²⁻ e N₂O.

Características nutricionais - Em aerobiose, 87,8% dos hidratos de carbono são utilizados como fonte de carbono, sendo os substratos de crescimento por excelência de *Bacillus circulans* (1). O índice médio de utilização (IMU) dos substratos orgânicos como fonte de carbono pelas estirpes está na Tabela 3.

Os substratos orgânicos abaixo não são utilizados como fonte de carbono pelas estirpes: hidratos de carbono - L-sorbose, D- e L-fucose, sacarato e mucato (galatarato); ácidos orgânicos - D-lactato, acetato, propionato, butirato, crotonato, isobutirato, valerato, isovalerato, caproato, perlagonato, malonato, succinato, glutarato, adipato (hexanodióico), pimelato (heptanodióico), suberato (octanodióico), sebacato (decanodióico), azelaidato (nonanodióico), maleato, itaconato (metilsuccínico), mesaconato (metilfumárico), citraconato (metilmaleíco), citrato, DL-isocitrato, trans-aconitato, cis-aconitato, α -cetoglutarato, levulinato (acetilpropiónico), D-malato, D-tartarato, L-tartarato, meso-tartarato, DL-3-hidroxibutirato, gliconato, e β -hidroxi- β -metylglutarato; álcoois e derivados - D-dulcitol, meso-eritritol, ribitol, 1,2-etanediol, 1,2-propanediol, 2,3-butanediol, etanol, propanol, butanol e isobutanol; aminoácidos-glicina, α -D-alanina, α -L-alanina, β -alanina, DL-valina, DL-norvalina, L-leucina, L-norleucina, L-isoleucina, DL-serina, DL-treonina, DL-aspartato, L-asparagina, L-glutamato, L-glutamina, L-lisina, L-arginina, DL-ornitina, L-citrulina, L-histidina, L-fenilalanina, L-tirosina, L-prolina e 4-amino-n-butirato; aminas e amidas - histamina, acetamida, propionamida, etanolamina, n-butilamina, n-amilamina, putreascina, espermina, nicotinato, hipurato e d-pantotenato; compostos aromáticos - benzoato, p e m-hidroxibenzoato, ftalato, isoftalato,

tereftalato, L- e D-mandelato, álcool benzílico, quinato, shiquimato (3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexano), cinamato (β -fenilacrílico), p-aminobenzoato, quinurenato (4-hidroxiquinaldico), naftaleno, fenilacetato, fenilpropionato, fenilbutirato, p-hidroxifenilacetato, p-hidroxifenilpropionato, ciclohexano-carboxilato, protocatecuato (3,4-diidroxibenzóico), gentisato, fenol, o-, m e p-cresol, 3,4-, 2,3- e 2,4-dimetilfenol, 2,3-diidroxibenzoato, 3-metoxibenzoato, vanilato, veratrato (3,4-diidroxibenzóico), trimelitato (1,2,4-benzenotricarboxílico), m e p-cumínico (m e p-isopropilbenzóico), cafeato, hidrocafeato e ferulato (4-hidroxi-3-metoxicinâmico).

Discussão

A espécie *B. circulans* apresenta uma amplitude de características fenotípicas tal que as estirpes conhecidas "exibem variações em diferentes direções" (5). Estudos morfológicos, nutricionais e fisiológicos de 38 estirpes de *B. circulans*, ilustram essa heterogeneidade (6). A grande maioria destas estirpes apresenta pelo menos uma das três características que definem a espécie *B. alvei*: resistência à lisozima, decomposição da caseína e ausência de crescimento a pH 5,7.

Os trabalhos até então publicados, definindo a espécie de *B. circulans*, abordam a morfologia deste grupo de maneira sucinta e estudam características nutricionais (1, 6).

O presente trabalho caracteriza detalhadamente a nutrição carbonada, a acidificação de meios de cultura contendo hidratos de carbono e a avaliação do estudo de outras características fisiológicas, como a produção de poli- β -hidroxibutirato, de H₂ e a presença das enzimas arginina-diidrolase, L-alanina e L-leucina-desidrogenases, com vistas a uma taxonomia mais precisa.

O estudo morfológico das colônias e das células bacterianas efetuou-se conforme a descrição da literatura (1, 6), salientando-se que a maioria das estirpes se apresenta, ao microscópio óptico, em longas cadeias de até 7,2 μ m de comprimento (Tabela 1). O crescimento em cadeias é um dado que deve ser levado em consideração na taxonomia destas estirpes, pois, sendo *B. circulans* do grupo morfológico II, apresenta características que definem os grupos "rhizoid" e "medusa head" formados, respectivamente, por *B. subtilis*, *B. pumilus*, *B. licheniformis*, *B. firmus* e *B. cereus*'var. *mycoides*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, todos pertencendo ao grupo morfológico I (1).

As espécies do grupo morfológico I são consideradas Gram positivas e as do grupo II, Gram negativas ou variáveis (1, 6). Nossos resultados confirmaram os trabalhos anteriores, no entanto, a estirpe ATCC 4513 é Gram positiva. Existem casos ilustrativos na literatura que nos permitem indagar a validade da coloração de Gram para caracterização de *Bacillus* spp. isolados a partir de amostras de solo. *Bacillus azotoformans* é Gram negativo e apresenta ao microscópio eletrônico, parede celular característica das bactérias Gram positivas (15).

O estudo de 57 estirpes de *Bacillus* spp. isoladas de solo em meio de cultura contendo como fonte de carbono compostos aromáticos, demonstrou que a coloração de GRAM é variável para 22 estirpes sem levar em consideração o grupo morfológico ao qual pertencem (4).

A acidificação do meio de cultura contendo glicose, arabinose, xilose e manitol é característica do grupo "circulanas" (6). As estirpes estudadas acidificam estes e outros compostos orgânicos, têm catalase e hidrolisam o amido. Estas são características da espécie *B. circulans*.

As características que definem a estirpe holótipo ATCC 4513 de *B. circulans* são:

Características morfológicas - Pertence ao grupo morfológico II, é móvel com flagelos peritríquigos, apresenta endosporos ovais subterminais, deformando sensivelmente a célula, medindo 1,2 x 1,8 μ m e células em forma de bastonetes medindo 0,9 x 3,6 μ m, formando cadeias de até 7,2 μ m, colônias lisas, convexas, transparentes com bordas irregulares e/ou inteiras.

Características fisiológicas e bioquímicas - Presença de catalase, β -galactosidase

e L-glutamato-desidrogenase, hidrolisa o amido e o "Tween 80", é auxotrófica e mesófila. Cresce em presença de NaCl 7%, é anaeróbica facultativa fermentando o meio de cultura com glicose e acidifica os meios de cultura contendo: arbutina, cellobiose, D-arabitol, dulcitol, D-gluconato, D-sorbitol, D-treloose, esculina, galactose, glicerol, glicose, lactose, L-arbitol, L-arabinose, L-arabinose, levulose, 6-desoxi-L-manoose, maltose, manitol, manose, melezitose, melibiose, α-metil-D-glucosídeo, rafinose, ribose, sacarose, salicina e xilose.

Características nutricionais - Utiliza os seguintes substratos como fonte de carbono: hidratos de carbono-D-glicose, D-galactose, D-manoose, frutose, α-metil-D-glucoronato, D-xilose, D-arabinose, L-arabinose, 6-desoxi-L-manoose, D-ribose, salicina, inosina, lactose, maltose, sacarose, cellobiose, melibiose, treloose, arbutina, melezitose, rafinose, amido, inulina, 2-ceto-D-gluconato e glucosamina; ácido graxo - ácido caprônico; ácido dicarboxílico - fumarato; cetoácido - piruvato; hidroxiácido - L-malato e L-lactato; álcoois e derivados - D-manitol, D-sorbitol, D- e L-arabitol e glicerol.

Não há utilização de ácidos tricarboxílicos, aminoácidos, aminas, amidas e compostos aromáticos como fonte de carbono para crescimento bacteriano.

$G + C = 37,3$ moles %

ATCC 14176 e ATCC 4530 não fazem parte do grupo "circulans". ATCC 14176 é aeróbica estrita, oxidase positiva e seu $G + C = 51,0$ moles %. A média de teor de guanina e citosina de DNA para *B. circulans* é 35,0 moles % (13). De acordo com as características básicas acima, que definem a espécie de *B. circulans*, ATCC 14176 não pertence a este grupo. Pelo seu elevado $G + C$, a estirpe ATCC 14176 se aproxima de *Bacillus macerans* ($G + C = 50,0$ a 54,0 moles %), entretanto, esta espécie cresce em anaerobiose e produz gás a partir de hidratos de carbono e dextrinas cristalinas (16).

ATCC 4530 pertence ao grupo morfológico I e seu $G + C = 37,0$ moles %. Pelo teor de guanina e citosina do seu DNA e a sua capacidade de crescer em anaerobiose, ela se aproxima de *Bacillus cereus*. No entanto, *B. cereus*, não acidifica meios de cultura contendo arabinose, xilose e manitol, é resistente à lisozima e reduz o nitrato.

Os resultados obtidos pela análise das características apresentadas pelas estirpes ATCC 14176 e 4530 abram novas perspectivas de estudo. O grupo morfológico II comportava, até então, cepas bacterianas com crescimento anaeróbico facultativo (6), enquanto ATCC 14176 é aeróbica estrita e apresenta os outros caracteres que definem o grupo "circulans". ATCC 4530, por definição, pertence ao grupo morfológico I, em função de possuir endosporos ovóide, que não deformam a célula (6), mas não se enquadra em nenhuma espécie deste grupo, pois seu fenótipo é do grupo "circulans", de acordo com os parâmetros fisiológicos, bioquímicos e nutricionais já definidos acima.

Agradecimentos

Agradecemos a F. Van Lierde a execução técnica prestada, indispensável à realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Barjac, H. de & Bonnefoi, A. - Essai da classification biochimique de 64 *Bacillus* des groupes II et III représentant 11 espèces différentes. Ann. Inst. Pasteur, 122:463-473, 1972.
2. Bonde, G.J. - The genus *Bacillus*: an examination of 460 mesophilic strains. ISS Research Council's series nº 2, p.1-72, 1973.
3. Candeli, A.; Batolomeo, A. de; Mastrandrea, V. & Trotta, F. - Contribution to the characterization of *Bacillus megaterium*. Inst. J. Syst. Bact., 29:25-31, 1979.

4. Crapez, M.A.C. - Isolement à partir du sol et étude de Bactéries aérobies sporulées dégradant divers composés aromatiques. Université D'Aix-Marseille II. Faculté des Sciences de Luminy, Marseilla, França, 1982. (Tese de doutoramento).
5. Gibson, T. & Topping, L.E. - Further studies of the aerobic sporeforming bacilli. Soc. Agr. Bact. Abs., 43-44, 1938.
6. Gordon, R.E.; Haynes, W.C. & Pang, C.H.N. - The genus *Bacillus*. Agriculture Handbook n° 427, Department of Agriculture, Washington, 1973.
7. Harrigan, W.F. & McCane, M.E. - In: Laboratory methods in food and dairy microbiology. London, Academic Press, W.F. Harrigan, p.452, p.1976.
8. Hong, M.M.; Shen, S.C. & Braunstein, A.E. - Distribution of L-alanine dehydrogenase and L-glutamate dehydrogenase in bacilli. Biochim. Biophys. Acta (AMST), 36:288, 1959.
9. Hugh, R. & Leifson, E. - The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. J. Bact., 66:24-26, 1953.
10. Kovacs, N. - Identification of *Pseudomonas pyurocyana* by the oxidase reaction. Nature, 29:703, 1956.
11. Leminor, L. - La notion d'espèce dans le groupe *Salmonella*. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 92:207, 1958.
12. Marmur, J. - A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J. Mol. Biol., 3:208, 1961.
13. Normore, W.N. - Guanine plus cytosine composition of DNA of bacteria, fungi, algae and protozoa: Handbook of microbiology. Cleveland, Laskin Lechevalier C.R.C. Press, 1973.
14. Obermeier, N. & Poralia, K. - Some physiological functions of the L-leucine dehydrogenase in *Sacillus subtilis*. Arch. Microbiol., 109:59-63, 1976.
15. Pichinoty, F.; Barjac, H. de; Mandel, M. & Asselineau, J. - Description of *Sacillus azotoformans* sp. nov. Int. J. Syst. Bact., 33:660-662, 1983.
16. Piechaud, M.M. - Cours de Microbiologie Systematique (bactériologie). Institut Pasteur, 1971.
17. Schildkraut, C.L.; Marmur, J. & Doty, P. - Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its buoyant density in CsCl. J. Mol. Biol., 4:430, 1962.
18. Smith, N.R.; Gordon, R.E. & Clark, F.E. - Aerobic sporeforming bacteria. U.S. Dept. Agr. Monog., 16:1, 1952.
19. Stanier, R.Y.; Palleroni, N.J. & Doudoroff, M. - The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. J. Gen. Microbiol., 43:159, 1966.
20. Thibault, P.; Piechaud, M. & Vernon, M. - In: Matériel et méthodes utilisés en bactériologie. Paris, Librairie Maloine S.A., 1-109, 1963.
21. Wolf, J. & Chowdry, M.S.V. - In: Barker, A.N.; Gould, G.W. & Wolf, J. - Spore Research. New York, Academic Press, p.227-245, 1971.

PRESSENCE OF MYCOBACTERIUM MARINUM AND OTHER OPPORTUNIST MYCOBACTERIA IN SWIMMING POOL WATERS IN ARARAQUARA, SP

Clarice Queico Fujimura Leite
 Maria José Soares Mendes Giannini
 & Deise Pasetto Falcão

Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP
 Caixa Postal, 331
 14800 Araraquara, SP, Brasil

Recebido para publicação em 12/11/86

Véronique Lévy-Frébault
 & Hugo David

Service de la Tuberculose et des Mycobactéries
 Institut Pasteur
 25, rue du Docteur Roux
 75724 Paris Cedex 15, France

Summary

The isolation of *Mycobacterium marinum* is reported for the first time in Brazil. Swimming pool waters were examined for the presence of mycobacteria with the purpose of evaluating these samples as a possible source of pathogenic mycobacteria. Twenty four mycobacterial strains were isolated from 72 water samples. The frequencies of recovery were 37.5% for *M. gordonaë*, 20.8% for *M. chelonae*, 4.2% for *M. marinum*, 4.2% for *M. scrofulaceum*, 4.2% for *M. avium intracellulare*, and 29.2% of unidentified mycobacterial strains. These latter strains presented morphological and biochemical features identical to *M. gordonaë*, however mycolic acid determination allowed to recognize these strains as a new mycobacterial group. The usefulness and importance of mycolic acid profiles as a screening for the identification of environmental mycobacteria is stressed. It was concluded that swimming pool waters from Araraquara contained opportunistic, potentially, pathogenic mycobacteria that can cause infections in humans.

Resumo

Presença de Mycobacterium marinum e outras micobactérias oportunistas em águas de piscinas em Araraquara, SP

O isolamento de *Mycobacterium marinum* é relatado pela primeira vez no Brasil. Analisaram-se amostras de águas de piscinas quanto à presença de micobactérias, para avaliar a participação dessas águas como possível fonte de micobactérias patogênicas. Isolaram-se 24 cepas de micobactérias a partir de 72 amostras analisadas. A frequência de isolamento foi de 37,5% para *M. gordonaë*, de 20,8% para *M. chelonae*, de 4,2% para *M. marinum*, de 4,2% para *M. scrofulaceum*, de 4,2% para *M. avium-intracellulare* e de 29,2% para cepas não pertencentes a qualquer espécie de micobactérias conhecida. As cepas não identificadas constituem um novo grupo de micobactérias com características morfológicas e bioquímicas semelhantes às de *M. gordonaë* mas com um perfil de ácidos micólicos distinto. Salienta-se, em consequência, a importância do estudo

dos ácidos micólicos no rastreio de identificação de micobactérias do ambiente. Concluiu-se que as águas das piscinas de Araraquara contêm micobactérias oportunistas potencialmente patogênicas para o homem.

Introduction

Mycobacterium marinum as most of the mycobacteria except the tubercle bacilli can be recovered from the environment. *M. marinum* causes in man cutaneous infections usually characterized as a solitary or multiple indolent granuloma. Lesions develop at points of trauma, mainly on knees, elbows, feet and hands. The ascending, proximal distribution of satellite lesions on legs and arms can strongly evocate sporotrichosis without involvement of regional lymph node. The infection is self-limited and lesions generally resolve spontaneously or after excision and extensive drainage (22). However this does not mean that *M. marinum* is a low pathogen as, similarly to the tubercle bacilli and to the opposite of most of the other mycobacteria, the isolation of *M. marinum* in man is always indicative of an infection. The bacteriological identification of *M. marinum* from a human sample equals to a diagnosis of a mycobacterial infection. That is the reason why the sources of *M. marinum* in the close environment of man have to be carefully controlled.

M. marinum is known to occur in the environment specially in water (2, 10). A few reports mention isolation of *M. marinum* from fresh and salt waters in North America (9, 23) and in France from salt rivers (20). Despite numerous studies on isolation of mycobacteria from tap water, *M. marinum* has never been recovered from such samples (2, 10). The main source of the organism consist of swimming pools and fish tanks. A recent review on aquarium-borne infections due to *M. marinum* can be usefully consulted (6). Considering the swimming pool outbreaks, the most impressive reports about number of cases are those occurred in Sweden (14) in 1954 (80 cases) and in Colorado, USA (17) in 1961 (290 cases). Many sporadic cases have then been described in various geographic regions, mainly USA and Northern Europe (5, 7), UK (21), France (4) and Germany (8), confirming the association of infection due to *M. marinum* and the isolation of the organism from swimming pools.

The purpose of this study is to describe the first isolation of *M. marinum* from swimming pool water in Brazil. The isolation of other opportunistic mycobacteria from these waters is also reported.

Material and Methods

Water samples - The collection of samples was made during a 12 month period (November 1984 to October 1985). The samples were taken during the time of high frequentation of the swimming pools. Each sample was taken from about 30cm of depth in a sterilized propylene bottle, with sodium thiosulfate, in order to obtain a final concentration of 100mg/l. For determination of residual chlorine another aliquot was collected at the same time and under the same conditions, but without sodium thiosulfate. Residual chlorine concentrations were assayed according to APHA method (1).

Mycobacterial isolation - In order to isolate mycobacteria, water samples were submitted to the same treatment than previously applied to tap water samples (12). One liter of water was filtered through 0.45 μ m filter membrane. The membrane was broken up and treated with H₂SO₄ at 4% for 10 minutes and afterward with 30% NaOH until neutralization was achieved. The material was centrifuged for 10 minutes and 0.2ml of the sediment was inoculated on 8 slants of Löwenstein-Jensen medium. The cultures were incubated at 30°C and 37°C, and were examined daily for 7 weeks.

Mycobacterial identification - Cultures were checked for purity using the Ziehl-Neelsen technique. Cultures of acid fast bacilli were mailed to the Institut

Pasteur, Paris, France, for identification. The strains were identified according methods recommended there (11, 15, 18). The identification was completed by analysis of the mycolic acid profile of the isolates using methods previously described (3, 13).

Results and Discussion

Table 1 indicates the source of the mycobacterial isolates and the chlorine concentration of the water samples. Different species could be isolated from the same swimming pool. Mycobacteria were recovered at any time of the year. Chlorination levels of the water samples are all very low, with a maximum of 0.6mg/ml. This is due to the fact that all the swimming pools concerned by the study, chlorination was performed only once a week, on Monday morning. All the samples were taken on Sunday, during the highest frequency of bathing. However it has been underlined many times that mycobacteria are resistant to chlorination treatments usually applied to swimming pools. Specially *M. marinum* is resistant to very high levels of chlorine up to 10mg/ml (9).

Table 1 - Distribution of 24 Mycobacterial strains, isolated from 72 water samples, according to the origin and the residual chlorine content.

Swimming pool	Isolation n°	n° of the strain	Month/year	Mycobacteria	Chlorine (mg/l)
1	5	5 P	11/84	<i>M. marinum</i>	0,34
		23 P	01/85	Unidentified	0,22
		35 P	02/85	Unidentified	0,00
		50 P	04/85	Unidentified	0,00
		71 P	06/85	<i>M. chelonei</i>	0,00
		33 P	02/85	<i>M. scrofulaceum</i>	0,00
2	6	33 P	Unidentified		
		55 P	04/85	Unidentified	0,44
		69 P	05/85	<i>M. gordonaie</i>	0,00
		83 P	06/85	<i>M. avium-intracellulare</i>	0,35
		83 P	<i>M. gordonaie</i>		
		7 P	11/84	<i>M. chelonei</i>	0,38
3	7	44 P	03/85	<i>M. chelonei</i>	0,60
		51 P	04/85	<i>M. gordonaie</i>	0,28
		59 P	05/85	<i>M. gordonaie</i>	0,00
		92 P	08/85	<i>M. chelonei</i>	0,40
		101 P	09/85	<i>M. gordonaie</i>	0,13
		104 P	10/85	Unidentified	0,00
4	1	24 P	01/85	<i>M. gordonaie</i>	0,00
		6 P	11/84	<i>M. chelonei</i>	0,34
		38 P	02/85	Unidentified	0,28
5	4	45 P	03/85	<i>M. gordonaie</i>	0,63
		98 P	98/85	<i>M. gordonaie</i>	0,21
6	1	39 P	02/85	<i>M. gordonaie</i>	0,10

The cultural and biochemical properties of the mycobacterial strains isolated during this investigation are described in Table 2.

M. marinum is easily identified on the basis of the following features: growth in less than 5 days at 30°C, growth at 30°C and not at 37°C (or strongly inhibited at this temperature), nitrate reductase negative, photochromogenicity of the pigmentation. Table 3 shows the key-tests useful for the discrimination of *M. marinum* from the other photochromogenic mycobacterial species *M. Kansasii*. It has to be noted that some *M. marinum* strains can present a positive niacin test as well

Table 2 - Properties of mycobacterial isolates from swimming pool waters as compared to the properties of representative strains of the same species. Types strains used: *M. marinum* ATCC 927; *M. avium-intracellulare* ATCC 13950; *M. scrofulaceum* ATCC 19981; *M. chelonae* NCTC 946; *M. gordonaiae* ATCC 14470.

Symbols: *¹ ND = Not done; *² medium base = Löwenstein-Jensen; *³ NH2OH = 250µg/ml of hydroxylamine; *⁴ Capreo = 40µg/ml of Capreomycin; *⁵ Cyclo = 30µg/ml of D-cycloserine; *⁶ EMB = 2mg/ml of Ethambutol; *⁷ PAS = 2µg/ml of p-aminosalicylate; *⁸ TCH = 2µg/ml thiophen-2-carboxylic acid hydrazide; *⁹ TB1 = 10µg/ml thiosemicarbazone; *¹⁰ PNB = 500µg/ml of p-nitrobenzoic acid.

	<i>M. marinum</i> T.strain Water Isolated	<i>M. avium-Intra cellulare</i> T.strain Water Isolated	<i>M. scrofulaceum</i> T.strain Water Isolated	<i>M. chelonae</i> T.strain Water Isolated	<i>M. gordonaiae</i> T.strain Water Isolated	Species Unidentified Water Isolated	Species Unidentified Water Isolated
Growth at							
30°C	+	+	-	-	-	100	100
30°C, <5d	ND	+	ND	-	-	0	0
37°C	-	-	ND	-	-	100	100
37°C, <5d	ND	-	ND	-	-	0	0
Growth on Nutritive agar							
30°C	+	+	-	ND	-	ND	ND
37°C	-	-	-	ND	-	ND	ND
Pigmentation							
dark	-	-	-	-	-	100	100
light	+	+	+	+	+	0	0
Niacin	-	-	-	-	-	0	0
Enzyme activity							
Aryl Catalase	-	+	-	-	+	100	27,0
22°C	-	-	-	-	-	100	100
63°C	+	+	+	+	+	100	100
β-D-glucosidase	-	ND	-	-	-	0	0
Nitrate-reductase	-	-	-	-	-	0	0
Penicillinase	-	ND	-	-	-	0	0
Tween 80: hydrolisis	-	ND	-	-	-	100	100
Urease	-	-	-	-	-	ND	0
Iron uptake	-	ND	ND	ND	-	ND	ND
Growth on McConkey agar	-	ND	ND	ND	-	ND	ND
Growth in presence of:							
S S NaCl	-	ND	-	ND	-	ND	ND
NH2OH	-	-	-	-	-	100	100
Capreo	-	ND	-	-	-	0	0
Cyclo	-	-	-	-	-	0	0
EMB	-	-	-	-	-	0	0
PAS	-	ND	-	-	-	0	0
TCH	-	-	-	-	-	100	100
TB1	-	ND	-	-	-	100	100
PNB	-	ND	-	-	-	100	100

as a thermolabile catalase. For these latter strains misidentification with *M. tuberculosis* could occur if identification is performed at 37°C only. At 37°C, *M. marinum* growth is strongly inhibited, a few colonies could appear in two weeks on Löwenstein-Jensen medium. As the key-tests for *M. tuberculosis* identification included a positive niacin test and a thermolabile catalase, it is of importance to perform mycobacterial identification in parallel at the two temperatures, 30°C and 37°C.

The saprophytic species, *M. gordonaiae* (previously referred as "*M. aquae*"), as well as the potential pathogens *M. avium-intracellulare*, *M. scrofulaceum* and *M. chelonae* have been extensively reported to occur in the environment including swimming pools (2, 10, 19).

The properties listed in Table 2 are unable to discriminate *M. gordonaiae* from the two unidentified groups of mycobacteria of 4 and 3 strains respectively. These two groups are differentiated from each other and from *M. gordonaiae* only on the basis of their mycolic acid profiles. *M. gordonaiae* contains α-, methoxy- and keto-mycolates whereas the two unidentified groups present different profiles with α-, keto-, and dicarboxy-mycolates or α-, methoxy-, keto-, and dicarboxy-mycolates. Such a profile with these four mycolates has been described for only one species, the so called ADM (annadillo derived mycobacteria, 18). The determination of mycolate patterns by

Table 3 - Key tests for the differentiation of *M. marinum* and *M. kansasii*

Symbols: *v = Variable. Some strains of *M. marinum* can present a positive niacin production as well as a thermolabile catalase.

Species	Growth at 30°C, 5d	Growth on Nutrient agar 30°C	Growth on Tbl	Nitrate reductase	Niacin	Catalase 68°C
<i>M. marinum</i>	+	+	+	-	v*	v*
<i>M. kansasii</i>	-	-	-	+	-	+

thin-layer chromatography has already proven its usefulness for the identification of mycobacteria (3, 13, 16). This now all the strains of a same species share the same pattern and thus different profiles correspond to different species. By now we verify that these two unidentified groups represent new species by using DNA/DNA hybridization.

This method of determination of acid mycolic content is of particular interest for the study of mycobacteria in the environment as many species other than those isolated from man can be encountered. Mycolic acid determination by such a simple technique as thin-layer chromatography constitutes a useful screening for the first step identification of these mycobacteria and can be the only means to recognize new species undetectable by classical tests.

In conclusion we would like to stress the usefulness of mycolic acid determination for the identification of mycobacteria. In addition our study strongly underlines the necessity to control carefully the potential sources of *M. marinum* in the human environment specially in swimming pools, where a lot of people can be simultaneously infected.

Acknowledgements

This work was supported by FAPESP: grant 84/1861-5 and CNPq: grant 40006/84.

References

1. American Public Health Association. Standard method for the examination of water and wastewater. 15ed. Washington, APHA, AWWA, WPCF, 1980.
2. Collins, C.H.; Grange, J.M. & Yates, M.D. Mycobacteria in water. *J. Appl. Bacteriol.*, 57:193-211, 1984.
3. Daffe, M.; Laneille, M.A.; Asselineau, C.; Lévy-Frébault, V. & David, H.L. Intérêt taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. *Ann. Microbiol. (Paris)* 134B:241-256, 1983.
4. Dailloux, M.; Morlot, M. & Sirbat, C. Study of factors affecting the presence of atypical mycobacteria in water of a swimming pool. *Rev. Epidém. Santé Publ.*, 28:299-306, 1980.
5. Evan Paz, Z.; Haas, H.; Sacks, I. & Rosenman, E. *Mycobacterium marinum* skin infections mimicking leishmaniasis. *Brit. J. Dermatol.*, 94:435-442, 1976.
6. Huminer, D.; Pitlik, S.D.; Block, C.; Kaufman, L.; Anit, S. & Rosenfeld, J.B. Aquarium-borne *Mycobacterium marinum* skin infection. *Arch. Dermatol.*, 122:698-703, 1986.
7. Jolly, H.W. & Seabury, J.H. Infections with *Mycobacterium marinum*. *Arch. Dermatol.*, 106:32-36, 1972.
8. Junger, H. & Witzani, R. "Swimming pool granuloma" Infection of skin with *Mycobacterium marinum*. *Zeits. Hautkrank.*, 56:16-18, 1981.

9. Kasatiya, S.S.; de Thokoly, I. & Guertin, M. Mycobactéries atypiques isolées des eaux de surface au Québec. Rev. Epidém., Méd. soc. et Santé Publ., 22:171-184, 1974.
10. Kubin, M. Distribution and ecology in non-living reservoirs: opportunists and pathogens. pp 1313-1338. In "The mycobacteria. A sourcebook", G.P. Kubica and L.G. Wayne eds, New York and Basel, Marcel Dekker, 1984.
11. Lévy-Frébault, V.; Grandry, J. & David, H.L. Evaluation of rapid tests for the identification of mycobacteria. J. Med. Microbiol., 15:575-577, 1982.
12. Lévy-Frébault, V. & David, H.L. Contaminant du réseau d'eau potable d'un hôpital. Rev. Epidém. Santé Publ., 31:11-20, 1983.
13. Lévy-Frébault, V.; Goh, K.S. & David, H.L. Mycolic acid analysis for clinical identification of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria; J. Clin. Microbiol., 24:835-839, 1986.
14. Linell, F. & Norden, A. *Mycobacterium balnei*: new acid fast bacillus occurring in swimming pools and capable of producing skin lesions in humans. Acta. Tuberc. Scand. suppl., 33:1-84, 1954.
15. Meyer, L. & David, H.L. Evaluation de l'activité uréase et de l'activité β -glucosidase pour l'identification pratique des mycobactéries. Ann. Microbiol. (Paris), 130B:323-332, 1979.
16. Minnikin, D.E.; Minnikin, S.M.; Parlett, J.H.; Goodfellow, M. & Magnusson, M. Mycolic acid patterns of some species of *Mycobacterium*. Arch. Microbiol., 139:225-231, 1984.
17. Philpott, J.A., Jr; Woodburne, A.R.; Philpott, O.S.; Schaefer, W.B. & Mollohan, C.S. Swimming pool granuloma. A study of 290 cases. Arch. Dermatol., 88:158-162, 1963.
18. Portaels, F.; Asselineau, C.; Baess, I.; Daffé, M.; Dobson, G.; Draper, P.; Gregory, D.; Hall, R.M.; Imaeda, T.; Jenkins, P.A.; Lanéelle, M.A.; Larsson, L.; Magnusson, M.; Minnikin, D.E.; Pattyn, S.R.; Wieten, G. & Wheeler, P.R. A cooperative taxonomic study of mycobacteria isolated from armadillo infected with *Mycobacterium leprae*. J. Gen. Microbiol., 132:2693-2707, 1986.
19. Saito, H. & Tsukamura, M. *Mycobacterium intracellulare* from public bath water. Japan. J. Microbiol., 20:561-563, 1976.
20. Viallier, J. & Viallier, G. Inventaire des mycobactéries de la nature. Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 53:361-371, 1973.
21. Waddington, E. An outbreak of swimming pool granuloma. Transact. St. John Hosp. Dermatol. Soc., 53:122-124, 1967.
22. Wolinsky, E. Nontuberculosis mycobacteria and associated diseases. Amer. Rev. Resp. Dis., 119:107-159, 1979.
23. Zeligman, I. *Mycobacterium marinum* granuloma. A disease acquired in the tributaries of Chesapeake Bay. Arch. Dermatol., 106:26-31, 1972.

AVALIAÇÃO DE DOIS MEIOS DE TRANSPORTE NO ISOLAMENTO DE ENTEROBACTERIAS PATOGÉNICAS*

Nilma Cintra Leal

Tania Ivo Robalinho Cavalcanti

Recebido para publicação em 16/11/87

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - FIOCRUZ

Campus da UFPE

Caixa Postal 7472 Recife PE, Brasil

Marinalva Ferreira da Costa

Fundação de Saúde Amaury de Medeiros

Praça Oswaldo Cruz s/n

Recife PE, Brasil

Dália dos Prazeres Rodrigues

& Ernesto Hofer

Fundação Oswaldo Cruz

Caixa Postal 926

Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Dois meios de cultura disponíveis comercialmente (Cary & Blair e Amies) e recomendados para o transporte de material fecal foram comparados quanto à capacidade de conservação de enterobactérias patogênicas, em períodos não epidêmicos. O emprego dos meios de transporte não provocou queda significativa nos isolamentos de *Salmonella* e *Escherichia*, enquanto maior percentual de isolamento de *Shigella* foi obtido com as fezes processadas "in natura".

Summary

Comparison of some transport culture media for pathogenic enterobacteria

Two culture media commercially available (Cary & Blair and Amies) recommended for shippment of fecal material were compared for their ability in the preservation of pathogenic enterobacteria during non-epidemic period. The use of the transport media brought no significant loss in the isolation of *Salmonella* and *Escherichia*, while higher rates of isolation of *Shigella* have been obtained when the stools were analysed "in nature".

Introdução

A eficiência da análise bacteriológica de espécimes clínicos, em particular das fezes, está diretamente relacionada ao transporte e/ou conservação do material até a execução da tarefa laboratorial.

O emprego de meios de cultura no transporte de fezes se tornou um processo comum,

* Trabalho financiado em parte pelo CNPq.

indicado e aplicado principalmente quando da ocorrência de surtos epidêmicos em locais distantes dos grandes centros (13). Na situação epidêmica, o percentual de patógenos é elevado de modo que uma perda relativa de eficiência do meio de transporte na conservação das bactérias não chega a invalidar o diagnóstico do acontecimento.

No Brasil, grande parte dos processos diarréicos apresenta caráter endêmico, podendo também os agentes bacterianos ser encontrados em portadores saúes. Nesses casos, as enterobactérias patogênicas aparecem em número relativamente pequeno, e não raro é impossível a realização das coproculturas com fezes "in natura", tornando-se necessário conservá-las para transporte e exame posterior.

De um modo geral a bibliografia sobre o comportamento de meios de transporte para fezes é escassa, tanto no Brasil como no exterior. Quanto à eficiência dos meios de cultura comercializados e propostos para acondicionamento e transporte de fezes para coprocultura, falta comprovação em nossas condições ambientais.

A proposta do presente trabalho é comparar a eficácia de 2 meios de transporte disponíveis comercialmente para acondicionamento de fezes, por períodos e em temperaturas diferentes, para verificação do melhor processo de preservação fecal para cultura bacteriológica em épocas não epidêmicas.

Material e Métodos

De novembro de 1982 a novembro de 1983 foram examinadas 238 amostras de fezes diarréicas de crianças até 5 anos de idade, residentes em áreas de baixas condições sanitárias, que convergem para dois hospitais de reidratação do Recife, Pernambuco.

O trabalho foi dividido em três etapas: a primeira, no período de novembro/82 a abril/83 durante a qual, 91 espécimes foram acondicionados em Cary & Blair (2), Difco, a 4°C por 24 e 48 horas; na segunda etapa, de abril/83 a agosto/83, 98 amostras foram mantidas em Amies (1), Difco, a 4°C por 28 e 48 horas e finalmente na 3ª etapa de setembro/83 a novembro/83, 49 espécimes foram conservados nos meios de Cary & Blair e Amies a temperatura ambiente ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) por 24 e 48 horas. Como controle, as amostras foram analisadas "in natura", paralelamente ao acondicionamento nos meios de transporte.

As fezes "in natura" e o material retirado dos meios de transporte foram homogeneizados em salina glicerinada tamponada e após 6 horas à temperatura ambiente foram plaqueados em ágar eosina azul de metíleno (EMB-Difco), ágar SS (Difco), inoculados em caldo tetratrationato de Kauffmann (Merck) e incubados a 37°C por 24 horas. O crescimento a partir do tetratrationato foi posteriormente plaqueado em ágar Hektoen (Di fco) e incubado a 37°C por 24 horas.

Adotou-se repicar 10 colônias lac⁺ crescidas em ágar EMB, para TSI (Difco) na tentativa de isolamento de *E. coli* e outras cinco colônias lac⁻ de cada um dos meios seletivos indicadores para TSI e agar-lisina-ferro (LIA-Difco), visando identificação das outras enterobactérias pesquisadas.

As *E. coli*, *Salmonella* e *Shigella* reconhecidas bioquímicamente foram em seqüência caracterizadas sorologicamente, utilizando-se a técnica de aglutinação rápida em presença de soros hiperimunes, somáticos e flagelares, provenientes do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), de acordo com as orientações de Kauffmann (6), Edwards & Ewing (4) e Costa & Hofer (3).

As cepas de *Shigella* identificadas bioquímica e sorologicamente foram submetidas ao teste de Sereny (10), para verificar a ação invasiva.

A análise estatística foi procedida pelo método do qui-quadrado, ao nível de significância de 10%, $p=0,1$ (12).

Resultados

Nas 238 fezes analisadas "in natura" (sem passagem nos meios de transporte) 48 (19,75%) amostras apresentavam pelo menos um dos agentes etiológicos pesquisados.

Na Tabela 1 procurou-se associar as freqüências de isolamentos às várias condições impostas ao material clínico.

Tabela 1 - Distribuição dos percentuais de positividade das coproculturas em relação às várias condições impostas ao material clínico.

Símbolos: * = Nesta etapa as fezes foram implantadas simultaneamente nos dois meios e apresentaram idênticos percentuais de positividade. Análise Estatística: a. χ^2 6,07 p>0,1; b. χ^2 3,70 p>0,1; c. χ^2 0,38 p<0,1; d. χ^2 = 1,46 p<0,1; e. χ^2 = 0,63 p<0,1.

Períodos	Fezes "in natura"		Acondicionamento	24h		48h	
	Nº de exames	% positivos		Nº de exames	% positivos	Nº de exames	% positivos
Nov./82 a	91	14,28 (b,c)	Amies-49C	91	10,20 (a,c)	91	14,28
Abri./83							
Abri./83 a	98	25,51 (b,d)	Cary & Blair-49C	98	23,46 (a)	98	18,36 (d)
Ago./83							
Set./83 a	49	18,36 (e)	Amies e* Cary & Blair Temp. amb.	49	10,20	49	8,16 (e)
Nov./83							

As Tabelas, 2, 3 e 4 expressam os resultados sobre a frequência e distribuição dos isolamentos das enterobactérias patogênicas segundo as diferentes condições de tratamento dos espécimes fecais.

Todas as *Shigella*, inclusive aquela em fase rugosa, submetidas ao teste de Sereny produziram cerato conjuntivite em cobaias.

Discussão

O ensaio realizado visou avaliar a eficácia dos processos de acondicionamento da matéria fecal até a análise no laboratório.

Este estudo tornou-se oportuno, uma vez que, em trabalho anterior, Leal & Col. (em publicação) utilizando meio de Cary & Blair a 49°C para conservação de fezes provenientes de processos diarréicos de pacientes da cidade do Recife, obtiveram percentuais de isolamento inferiores aos achados por outros autores, com fezes "in natura", em outras cidades do Brasil (5, 7, 8, 9). Naquele experimento não foi realizado controle com fezes "in natura"; entretanto, a permanência no meio de transporte por períodos que variam de 3-7 dias, não modificou o percentual de isolamento.

No presente trabalho o material permaneceu nos meios de transporte por 24 e 48 horas, nas temperaturas de 49°C e +

Tabela 2 - Freqüência de enterobactérias patogênicas isoladas de 99 amostras de fezes diarréicas, analisadas "in natura" e após conservação em meio de Amies.

Símbolos: * = Manitol+; ODC-.

Enterobactérias	Fezes "in natura"	Meio de Amies-49C	
		24 h	48 h
<i>Sal. typhimurium</i>	4	4	3
<i>Sal. mendenii</i>	1	1	1
<i>Sh. flexneri</i>	2	1	2
<i>Sh. sonnei</i>	2	1	2
<i>Shigella (rugosa)*</i>	1	-	1
<i>E. coli</i> 0111 K58	1	1	1
<i>E. coli</i> 055 K59	1	1	1
<i>E. coli</i> 0112ab K68	-	1	1
<i>E. coli</i> 0124 K72	1	-	1

Tabela 3 - Freqüência de enterobactérias patogênicas isoladas de 99 amostras de fezes diarréicas analisadas "in natura" e após conservação em meio de Cary & Blair.

Enterobactérias	Fezes "in natura"	Meio de Cary & Blair-49C	
		24 h	48 h
<i>Sal. typhimurium</i>	16	16	12
<i>S. flexneri</i>	5	4	1
<i>Sh. sonnei</i>	2	1	1
<i>E. coli</i> 0111 K58	-	-	1
<i>E. coli</i> 055 K59	1	1	1
<i>E. coli</i> 0119 K69	1	1	1
<i>E. coli</i> 028 K73	-	-	1

Tabela 4 - Freqüência de enterobactérias patogênicas isoladas de 49 amostras de fezes diarréicas, analisadas "in natura" e após conservação simultânea em meios de Cary & Blair e Amies.

Enterobactérias	Fezes "in natura"	Temperatura ambiente			
		Meio de Amies	Meio de Cary & Blair	24 h	48 h
<i>Sal. typhimurium</i>	1	1	1	2	2
<i>Sal. panama</i>	1	1	1	1	1
<i>Sal. albany</i>	1	-	-	-	-
<i>Sal. Grupo I</i> (6,7,r;-)	1	-	-	-	-
<i>Sh. sonnei</i>	2	1	-	1	-
<i>E. coli</i> 0111 K58	1	1	1	-	1
<i>E. coli</i> 0119 K69	1	-	1	-	-
<i>E. coli</i> 026 K60	1	-	-	-	-
<i>E. coli</i> 0142 K86	-	1	-	1	-

28°C, fazendo-se em paralelo um controle com as fezes examinadas "in natura".

Analizando conjuntamente os resultados das três amostragens de fezes examinadas "in natura" (Tabela 1), verifica-se que o percentual de isolamento de enteropatogênicos (19,75%) é comparável ao obtido no trabalho de Leal & Col. (19,02%) no qual as fezes permaneceram no Cary & Blair por 3-7 dias (em publicação).

Por outro lado, cada meio de transporte e temperatura de manutenção, apresentou um percentual de positividade similar ao do processo de semeadura direta. Entretanto, quando se compra na Tabela 1, a eficácia do Cary & Blair com o meio de Amies, ambos a 4°C, após 24 horas de acondicionamento, encontra-se uma diferença significativa ($\chi^2 = 6,07$ $p > 0,1$), o mesmo ocorrendo com as fezes examinadas "in natura" nas duas etapas do experimento ($\chi^2 = 3,70$ $p > 0,1$). Este achado sugere uma modificação sazonal nos índices de infecções bacterianas estéricas, uma vez que a elevação do número de isolamentos foi obtida nos meses de maior intensidade de chuvas, provocando alagamento e consequente deterioração das condições higiênico-sanitárias da população.

Com respaldo nos resultados obtidos no presente trabalho constata-se que os meios de transporte avaliados para a conservação de fezes destinadas a isolamento de bactérias, não proporcionaram diferenças significativas nos isolamentos de *Salmonella* e *Escherichia*. Todavia em relação ao isolamento de *Shigella*, a maior eficiência ocorre quando as fezes são processadas após envio recente. Resultados semelhantes, foram obtidos por Wells & Morris (11), avaliando o comportamento de *Shigella* em meio de Cary & Blair.

Agradecimentos

Agradecemos a Dra. Alzira Maria Paiva de Almeida e Dr. Miguel Archanjo Muniz Leal pelas críticas e sugestões.

Referências Bibliográficas

1. Amies, C.R. - A modified formula for the preparation of Stuart's transport medium. Can J. Public. Health, 58:296-300, 1967.
2. Cary, S.G. & Blair, E.B. - New transport medium for shipment of clinical specimens. J. Bacteriol., 88:96-98, 1964.
3. Costa, G.A. & Hofer, E. - Isolamento e identificação de enterobactérias. Instituto Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro, 120p., 1972.

4. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3ed. Burgess Public. Minnesota, 362p., 1972.
5. Giugliano, L.G. & Giugliano, R. - Etiologia das diarréias agudas em Manaus: observações ambulatoriais e na comunidade. Rev. Microbiol., São Paulo, 16:234-239, 1985.
6. Kauffmann, F. - Enterobacteriaceae. 2^a ed. E. Munksgard, Copenhagen, 382p., 1954.
7. Loureiro, E.C.B.; Serafim, M.B.; Linhares, A.C. & Castro, A.F.P. - *Escherichia coli* enterotoxigênica e rotavirus detectados em crianças com gastroenterite aguda em Belém, Pará. Rev. Microbiol., São Paulo, 14:129-135, 1983.
8. Pessôa, G.V.A.; Calzada, C.T.; Peixoto, E.S.; Melles, C.E.A.; Kano, E.; Raskin, M.; Simonsen, V. & Irino, K. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-76. III - Sorotipos de *Shigella* e de *Escherichia coli* da gastrenterite infantil. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:129-139, 1978a.
9. Pessôa, G.V.A.; Irino, K.; Calzada, C.T.; Melles, C.E.A. & Kano, E. - Ocorrência de bactérias enteropatogênicas em São Paulo no septênio 1970-1976. I - Sorotipos de *Salmonella* isolados e identificados. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 38:87-105, 1978b.
10. Sereny, B. - Experimental *Shigella* kerato-conjuntivitis: A preliminary report. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung., 2:293-296, 1955.
11. Wells, J.G. & Morris, G.K. - Evaluation of transport methods for isolating *Shigella* sp. J. Clin. Microbiol., 13:789-790, 1981.
12. Vieira, S. - Introdução à Bioestatística, 2^a ed. Rio de Janeiro, Ed. Campus, 294p., 1983.
13. WHO Bacterial Diseases Unit. - Guidelines for the laboratory diagnosis of cholera - WHO Geneva, 7-23, 1974.

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DE BACTÉRIAS FIXADORAS DE NITROGÊNIO AERÓBIAS, DE VIDA LIVRE, DE SOLO DE CERRADO

Heloiza Ramos Barbosa
 & Maria Ligia Coutinho Carvalhal

Recebido para publicação em 12/01/88

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

Resumo

Bactérias fixadoras de nitrogênio, aeróbias, de vida livre, foram isoladas de solo de cerrado e identificadas pela morfologia e por testes bioquímicos. As diferentes bactérias foram comparadas quanto à velocidade de crescimento e eficiência de fixação de nitrogênio.

Summary

Morfo-physiological aspects of free-living bacteria isolated from soil under cerrado

Free-living aerobic nitrogen fixing bacteria were isolated from soil under cerrado and characterized by morphological and biochemical tests. The values obtained for growth rate and efficiency of nitrogen fixation were compared.

Introdução

Um aproveitamento economicamente adequado dos cerrados somente poderá ser efetuado quando um amplo conhecimento de suas potencialidades já houver sido estabelecido. Cerrado é um tipo característico de vegetação que recobre 20 a 25% da área do território brasileiro (14), cujo solo apresenta muitos problemas para a sua utilização.

Até o presente, os vários estudos realizados conduzem apenas a uma caracterização parcial dos cerrados. Apesar da grande interferência dos microrganismos na biologia dos solos, os conhecimentos sobre a microbiologia dos cerrados carecem de dados fundamentais. Uma avaliação de bactérias totais (13) demonstrou que comparado com outros solos, o número é baixo, porém o número de actinomicetos é relativamente elevado (5). Especificamente em relação ao grupo de bactérias fixadoras de nitrogênio, Dobereiner (7) analisou 9 amostras de solo de cerrado com vegetação de ervilha, capoeira e eucalipto e encontrou 2 amostras positivas para bactérias do gênero *Beijerinckia* e quatro para o gênero *Azotobacter*. Não foram isolados os dois gêneros da mesma amostra. *Beijerinckia* foi encontrada nos solos com pH 5,1 e *Azotobacter* em solos com pH 5,9 ou superior.

Este trabalho teve por objetivo isolar de solo de cerrado bactérias fixadoras de nitrogênio, aeróbias, de vida livre e utilizando de características morfológicas e bioquímicas, identificá-las a nível de gênero. As diferentes bactérias foram comparadas quanto à velocidade específica de crescimento (μ) e eficiência de fixação de nitrogênio (E.F.).

Material e Métodos

Foram coletadas 25 amostras de solo superficial, de diferentes pontos de uma região delimitada em 100m², em Emaçá, Pirassununga, SP. Dez mg de cada amostra foram secados a 30°C e depositados em uma placa contendo meio de silice-gel isento de fonte de nitrogênio (9). Após incubação das placas a 30°C em câmara úmida, as colônias desenvolvidas foram transferidas para meio de manutenção (1) para a obtenção de culturas puras, das quais foi determinada a atividade da nitrogenase (11). Aquelas capazes de reduzir acetileno foram identificadas utilizando-se características morfológicas e provas bioquímicas. Colorações de grânulos de gordura, cápsulas e flagelos foram feitas pelos métodos de Bordon (16), Hiss e Zettnow (4) respectivamente. A caracterização bioquímica foi feita utilizando-se diferentes condições de crescimento: a) em meio de manutenção em aerobiose (atmosfera de N₂); b) em caldo e agar peptona; c) em meio MacConkey. As culturas realizadas nas condições a, b e c foram incubadas tanto a 30°C quanto 37°C; d) em meio de manutenção acrescido de KNO₃ 10mM + 0,1% de metilamina a 30°C (17). A determinação das E.F. (mg N fixado/g de glicose consumida) foi feita medindo-se, em fase estacionária (após crescimento em meio de manutenção com glicose a 0,2%), o N celular pelo método de Kjeldahl (15) e glicose do meio pelo método da O-toluidina (8). Os valores de velocidade específica de crescimento foram determinados a partir de curvas de crescimento realizadas em meio de manutenção líquido medindo-se A_{500nm} x tempo.

Resultados

O desenvolvimento das colônias no meio de silice-gel foi lento (10-20 dias). Quando isoladas em meio de manutenção liberaram grande quantidade de muco muito tenaz e elástico, tornaram-se gigantes (cerca de 1,5cm de diâmetro) e acidificaram o meio de cultura. Não ocorreu formação de película em meio líquido. O teste de redução de acetileno foi positivo para oito isolamentos. Estas bactérias apenas se desenvolveram a 30°C. As colorações evidenciaram bacilos Gram negativos, capsulados, sem flagelos, cistos ou esporos. Grandes corpos polares lipídicos refringentes intracelulares foram observados desde o início do crescimento. Todas as bactérias isoladas apenas se desenvolveram em aerobiose, utilizando glicose ou sacarose como fonte de carbono e energia e não cresceram em caldo ou agar peptona e em meio MacConkey. Apesar de crescerem em meio contendo KNO₃ foram inibidas quando a este foi acrescentada metilamina, indicando inibição da nitrogenase (18).

As características morfológicas foram indicativas de que as bactérias fixadoras de N₂ isoladas, pertenciam ao gênero *Beijerinckia*. A confirmação da identificação foi feita pelas provas bioquímicas. Os valores de E.F. e de μ encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de eficiência de fixação e de velocidade específica de crescimento dos oito isolamentos.

Isolamento nº	1	2	3	4	5	6	7	8
E.F. (mg.g ⁻¹)	10,7	11,6	11,9	9,6	7,8	9,3	7,1	10,3
$\mu \cdot 10^{-3}$	2,09	3,13	3,82	3,02	1,13	3,23	2,38	1,20

Discussão

A E.F. de determinada bactéria é um parâmetro fundamental na medida em que reflete o custo energético de seu processo de fixação e sua determinação fornece um dado importante para se avaliar o papel dos microrganismos fixadores de N₂ no

ambiente em que vivem. A velocidade de crescimento fornece, paralelamente, dados para se estimar a capacidade competitiva das bactérias. Becking (3) encontrou para *Beijerinckia* valores de E.F. entre 16,9 e 6,0, classificando-as como "boas", "moderadas" e "pobres" fixadoras. Portanto, as bactérias estudadas neste trabalho se enquadram entre as "moderadas" e "pobres". Assim também podem ser classificadas bactérias do gênero *Beijerinckia* isoladas de várias séries de solos de área territorial restrita do Brasil (6) que apresentaram E.F. que variaram de 12,4 a 5,9. Nossos resultados não mostraram nenhuma relação entre velocidade de crescimento e E.F.. No entanto, Becking (3) descreveu uma relação inversa e Grossmann & Dobereiner (10) encontraram uma relação direta.

Neste trabalho apenas o gênero *Beijerinckia* foi isolado. Este fato não pode ser explicado pelos valores encontrados para E.F. e μ , uma vez que são relativamente mais baixos que os de outras bactérias aeróbias fixadoras de nitrogênio (12). Portanto, a predominância desta bactéria, mais do que relacionada à competição, deve estar ligada a condições ambientais que favorecem o seu desenvolvimento e não o de outras bactérias. A laterização e a lixívia que, segundo Becking (2) conduzem respectivamente ao acúmulo de íons tóxicos como ferro e alumínio e à carência de íons cálcio, tornariam o solo de cerrado favorável ao desenvolvimento do gênero *Beijerinckia*.

Referências Bibliográficas

1. Barbosa, H.R. & Struckel, Y. Slime production by *Beijerinckia derxi*: effects of cultural conditions. *Soil Biol. Biochem.*, 17:731-732, 1985.
2. Becking, J.H. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I. geographical and ecological distribution in soils. *Plant and Soil*, 14:49-81, 1961.
3. Becking, J.H. Genus *Beijerinckia* Der 1950, 145 AL. In: Krieg, N.R., ed. - Bergey's manual for determinative bacteriology. Baltimore, Willians & Wilkins, v.1, p.311-321, 1984.
4. Bier, O. Bacteriologia e Imunologia. 14ed. São Paulo, Melhoramentos, 1970.
5. Coelho, R.R. & Drozdowicz, A. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil. *Rev. Ecol. Biol. Sol.*, 15:459-473, 1978.
6. Dobereiner, J. & Castro, A.F. Ocorrência e capacidade de fixação de nitrogênio de bactérias do gênero *Beijerinckia* nas séries de solos da área territorial do CNEPA. *Bol. Inst. Ecol. Exp. Agric.*, 16:1-18, 1955.
7. Dobereiner, J. Sobre a ocorrência de *Beijerinckia* em alguns estados do Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, Rio de Janeiro, 19:151-160, 1959.
8. Geeting, D.G.; Suther, C.A. & Sylbert, P. Determination of glucose in serum and whole blood: statistical relationships between values obtained by different methods. *Clin. Chem.*, 18:976-979, 1972.
9. Girard, H. & Rougier, R. Techniques de microbiologie agricole. Paris, Dunod, p.170, 1958.
10. Grossman, A. & Dobereiner, J. Diferenças fisiológicas entre tribos de bactérias do gênero *Beijerinckia* isoladas em solos brasileiros. *Ciência e Cultura*, São Paulo, VII:242, 1956.
11. Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K. & Burns, R.C. The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-1207, 1968.
12. Hill, S. Factors influencing the efficiency of nitrogen fixation in free-living bacteria. *Ecol. Bull.*, 26:130-136, 1978.
13. Linhares, L.F.T.L. & Drozdowicz, A. Atividade celulolítica em alguns solos brasileiros. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 3:91-100, 1972.
14. Malavolta, E.; Sarruge, J.R. & Bittencourt, V.C. Toxidez de alumínio e de manganês. In: Simpósio sobre o cerrado. 4, Brasília, 1976. São Paulo, Ed. da Univ. São Paulo. p.275-301, 1977.
15. Meynell, G.G. & Meynell, E. Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge University Press. 2ed. p.10-11, 1970.

16. Norris, J.R. & Swain, H. Staining bacteria. In: Norris, J.R. & Ribbons, D.W., eds. Methods in microbiology. London, Academic Press, v.5A, p.105-134, 1971.
17. Sorger, J.S. Regulation of nitrogen fixation in *Azobacter vinelandii* OP and in a apparently partially constitutive mutant. *J. Bacteriol.*, 95:1721-1726, 1968.
18. Sorger, J.S. Regulation of nitrogen fixation in *Azobacter vinelandii* OP: the role of nitrate reductase. *J. Bacteriol.*, 98:56-61, 1969.

PESQUISA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS ENTEROTOXIGÊNICOS EM LEITE DE VACAS COM MASTITE SUBCLÍNICA

Antonio Nader Filho
 Oswaldo Durival Rossi Jr.
 & Ruben Pablo Schocken-Iturrino

Recebido para publicação em 29/01/88

Deptº de Medicina Veterinária Preventiva
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP
 Campus de Jaboticabal
 Rodovia Carlos Tonanni, km 5
 14870 Jaboticabal SP, Brasil

Resumo

Foram examinados pelo "California Mastitis Test" (CMT) 497 vacas lactantes em 17 propriedades rurais produtoras de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto, São Paulo. Entre as amostras de leite procedentes das 59 (11,9%) fêmeas reagentes a esta prova, o *Staphylococcus aureus* foi isolado de 32 (54,2%). A verificação da capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas, revelou que 1 (1,3%) era produtora de enterotoxina do tipo B.

Summary

Research of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in milk from subclinical mastitic cows

The California Mastitis Test was applied in 497 lactating cows from 17 dairy farms producing high quality milk (type B), in the region of Ribeirão Preto, State of São Paulo, Brazil. From the milk samples coming from the 59 (11.9%) cows that were reagents to the CMT, *Staphylococcus aureus* was isolated in 32 (54.2%). The tests for the detection of enterotoxin showed that 1 (1.3%) produced enterotoxin type B.

Introdução

Vários fatores propiciam condições favoráveis para a contaminação de leite crú por *Staphylococcus aureus*, dentre os quais destacam-se, principalmente, a elevada prevalência deste microrganismo como agente etiológico da mastite bovina, sua ubiquidade na natureza e o baixo nível sócio-econômico dos ordenhadores, geralmente possuidores de maus hábitos higiênicos (21). Assim, diversas investigações tem evidenciado a presença do *S. aureus* em amostras de Leite crú (2, 4, 17, 21).

Estando presente no leite e encontrando condições que propiciam a sua multiplicação, o *S. aureus* pode, em algumas horas, atingir números elevados. Durante o período de multiplicação, dependendo da cepa, pode haver a produção de enterotoxina estafilocócica (9). A este respeito, algumas investigações tem sido realizadas em vários países, com a finalidade de verificar a ocorrência de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos, isolados a partir de amostras de leite crú (2, 5, 11, 19).

Embora o processo de pasteurização assegure a destruição das cepas de *S. aureus* presentes originalmente no leite crú, a enterotoxina pré-formada, responsável pela

intoxicação alimentar estafilocócica, pode permanecer no leite pasteurizado e seus derivados, devido a sua característica termoestável (17). Assim, vários surtos de intoxicação alimentar estafilocócica, atribuídos ao consumo de leite e derivados, são relatados em diversos países (6, 13).

Diante do exposto, e considerando as poucas informações a respeito, em nosso país, realizou-se o presente trabalho, com o objetivo de verificar a ocorrência de cepas de *S. aureus* enterotoxigênicos em leite de vacas mastíticas, de modo a avaliar o risco potencial de intoxicação alimentar estafilocócica para a população consumidora deste produto.

Material e Métodos

Foram examinadas pelo "California Mastitis Test" (18) 497 vacas lactantes em 17 propriedades rurais produtoras de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto, São Paulo. A escolha destes animais era efetuada ao acaso, sendo analisadas cerca de 60% das fêmeas lactantes em cada rebanho.

Diante dos resultados positivos e suspeitos ao "California Mastitis Test", colhiam-se em tubos de ensaio esterilizados, amostras de 50,0ml de leite dos quartos reagentes, de acordo com as normas propostas por Veissseyre (20).

As amostras, assim obtidas, eram acondicionadas em caixas de material isotérmico (isopor), contendo cubos de gelo e transportadas para o laboratório do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias "Campus" de Jaboticabal/UNESP.

Para o isolamento e identificação das cepas de *S. aureus*, foram utilizados o ágar Baird-Parker e ágar *Staphylococcus* 110, em placas (10), sendo as mostras de leite semeadas nestes meios de acordo com a técnica recomendada por Demeter (3).

Após a incubação por 24-48 horas, havendo o crescimento de colônias negras, brilhantes, com zona de precipitação ao redor e circundados ou não por halo claro em ágar Baird-Parker ou de colônias amareladas ou brancas em ágar *Staphylococcus* 110, procedia-se a verificação microscópica em esfregaços corados pelo método de Gram.

As colônias que se revelassem como sendo cocos Gram-positivos agrupados em forma de cachos, eram isoladas e semeadas em tubos contendo ágar nutritivo inclinado, sendo estes, a seguir, incubados a 37°C por 24 horas, para a identificação bioquímica.

A partir destas colônias, efetuavam-se as provas de produção de catalase (7), da oxidação e fermentação (O/F) da glicose (1), da coagulase livre, da DNase (10) e da termonuclease (12).

A verificação da capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas, foi realizada no Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas/USP.

A técnica utilizada para a produção de enterotoxina estafilocócica foi a de cultura em saco celofane, recomendada por Dennely (4). Por outro lado, a verificação da presença de enterotoxina nos extratos obtidos, foi realizada através do processo de imundifusão em ágar, segundo o método da "sensibilidade ótima em placas" (16), sendo utilizadas como padrões as enterotoxinas A, B, C, D, e E e as respectivas anti-enterotoxinas.

Resultados e Discussão

Os dados obtidos referem-se à ocorrência de casos de mastite subclínica, uma vez que nos rebanhos estudados não foi constada a presença de vacas com sinais da enfermidade.

Assim, os valores constantes da Tabela 1, mostram a distribuição das fêmeas reagentes e negativas ao "California Mastitis Test", de acordo com os rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto/SP. Observa-se que das 497 vacas examinadas, 59 (11,9%) foram reagentes e 438 (88,1%) negativas.

A Tabela 2 mostra a distribuição dos quartos reagentes e negativos ao "California

Tabela 1 - Fêmeas reagentes e negativas ao "California Mastitis Test", de acordo com os rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto/SP.

Rebanhos	Fêmeas		Reagentes		Negativas		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
A	6	25,0	18	75,0	24		
B	3	8,6	32	91,4	35		
C	4	8,0	46	92,0	50		
D	7	13,2	46	86,8	53		
E	6	20,7	23	79,3	29		
F	4	12,5	28	87,5	32		
G	3	10,0	27	90,0	30		
H	3	8,1	34	91,9	37		
I	2	3,7	52	96,3	54		
J	5	50,0	5	50,0	10		
K	1	7,7	12	92,3	13		
L	2	10,5	17	89,5	19		
M	4	20,0	16	80,0	20		
N	3	9,4	29	90,6	32		
O	2	6,7	28	93,3	30		
P	4	26,7	11	73,3	15		
Q	-	-	14	100,0	14		
Total	59	11,9	438	88,1	497		

Tabela 2 - Quartos reagentes e negativos ao "California Mastitis Test" e, quartos "perdidos", de acordo com os rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto/SP.

Rebanhos	Quartos		Reagentes		Negativos		"Perdidos"		Total
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	
A	8	8,3	87	90,6	1	1,0	96		
B	3	2,1	135	96,4	2	1,4	140		
C	4	2,0	193	96,5	3	1,5	200		
D	7	3,3	202	95,3	3	1,4	212		
E	8	6,9	106	91,4	2	1,7	116		
F	4	3,1	120	93,8	4	3,1	128		
G	4	3,3	113	94,2	3	2,5	120		
H	4	2,7	144	97,3	-	-	148		
I	2	0,9	210	97,2	4	1,9	216		
J	7	17,5	30	75,0	3	7,5	40		
K	1	1,9	50	96,2	1	1,9	52		
L	2	2,6	70	92,1	4	5,3	76		
M	5	6,2	74	92,5	1	1,3	80		
N	3	2,3	124	96,9	1	0,8	128		
O	2	1,7	117	97,5	1	0,8	120		
P	4	6,7	56	93,3	-	-	60		
Q	-	-	55	98,2	1	1,8	56		
Total	68	3,4	1886	94,9	34	1,7	1988		

"Mastitis Test", de acordo com os rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto/SP. Verifica-se que dos 1988 quartos examinados, 68 (3,4%) foram reagentes, 1886 (94,9%) negativos e 34 (1,7%) estavam "perdidos".

Os dados inseridos na Tabela 3, mostram a distribuição da frequência de isolamento de *S. aureus*, segundo o número de fêmeas e quartos reagentes ao "California Mastitis Test", nos rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto/SP. Observa-se que das 59 fêmeas e 68 quartos reagentes, o *S. aureus* foi isolado em 32 (54,2%) e 37 (54,4%), respectivamente.

Assim, a análise dos dados inseridos nas Tabelas de 1 a 3, revela que a proporção de fêmeas reagentes (11,9%) ao "California Mastitis Test", foi inferior às obtidas por Harrop & Col. (8) em Pernambuco, Nader Fº & Col. (14) em Barretos/SP e Nader Fº & Col. (15) em Jaboticabal/SP, cujos valores foram de 39,0%, 11,96% e 20,83%, respectivamente.

Observa-se, também, que a prevalência da mastite bovina causada por *S. aureus* na região de Ribeirão Preto/SP, foi de 6,4%, valor este que assemelha-se ao verificado por Nader Fº & Col. (14) em Barretos/SP, porém, é inferior aos obtidos por Harrop & Col. (8) em Pernambuco e Nader Fº & Col. (15) em Jaboticabal/SP, cujas proporções foram de 5,34%, 10,3% e 9,89%, respectivamente.

Depreende-se, ainda, em relação aos dados constantes das Tabelas de 1 a 3, que o *S. aureus* foi isolado das amostras de leite de 54,2% das fêmeas reagentes ao "California Mastitis Test", confirmado, portanto, os achados de Harrop & Col. (8) e Nader Fº & Col. (14), que verificaram positividades de 59,2% e 52,08%, respectivamente.

A verificação da capacidade enterotoxigênica das 74 cepas de *S. aureus* isoladas em amostras de leite das fêmeas reagentes ao "California Mastitis Test", evidenciou a presença de apenas 1 (1,3%) cepa produtora de enterotoxina do tipo B. Este achado é inferior aos obtidos por Kato & Kume (11) no Japão, Furlanetto & Col. (5) em Barretos/SP e Schöcken-Iturrino & Col. (19) em Jaboticabal/SP, que verificaram índices de 14,4%, 8,0% e 15,79%, respectivamente. Parece não haver explicações convincentes que justifiquem tais variações.

Embora tenha sido verificado a ocorrência de apenas 1 (1,3%) cepa

Tabela 3 - Frequência de isolamento de *S. aureus*, segundo o número de fêmeas e quartos reagentes ao "California Mastitis Test", nos rebanhos produtores de leite tipo B, na região de Ribeirão Preto/SP.
 Símbolos: (*) Em relação ao nº de análises efetuadas pelo C.M.T.; (**) Em relação ao nº de reagentes ao C.M.T.

Rebanhos	Amostras Péneas Reagentes	<i>S. aureus</i>			Quartos Reagentes	<i>S. aureus</i>		
		Nº	%*	%**		Nº	%*	%**
A	6	4	16,7	66,7	8	5	5,2	62,5
B	3	3	8,6	100,0	3	3	2,1	100,0
C	4	2	4,0	50,0	4	2	1,0	50,0
D	7	2	3,8	28,6	7	2	0,9	28,6
E	6	1	3,4	16,7	8	2	1,7	25,0
F	4	1	3,1	25,0	4	1	0,8	25,0
G	3	1	3,3	33,3	4	1	0,8	25,0
H	3	3	8,1	100,0	4	4	2,7	100,0
I	2	1	1,8	50,0	2	1	0,5	50,0
J	5	5	50,0	100,0	7	7	17,5	100,0
K	1	-	-	-	1	-	-	-
L	2	2	10,5	100,0	2	2	2,6	100,0
M	4	2	10,0	50,0	5	2	2,5	40,0
N	3	3	9,4	100,0	3	3	2,3	100,0
O	2	-	-	-	2	-	-	-
P	4	2	13,3	50,0	4	2	3,3	50,0
Q	-	-	-	-	-	-	-	-
Total	59	32	6,4*	54,2*	68	37	1,9*	54,4**

enterotoxigênica, de modo a representar reduzido risco de intoxicação alimentar estafilocócica para a população consumidora deste tipo de leite, os resultados desta investigação evidenciaram a ocorrência de falhas na aplicação de medidas higiênico-sanitários a nível de propriedade rural.

Acredita-se que sejam necessárias novas investigações desta natureza em nosso meio, com o objetivo de avaliar o risco que o leite pode representar para a saúde pública e, detectar os pontos críticos de contaminação deste produto, de modo a proporcionar condições favoráveis para a obtenção de um leite com qualidade microbiológica superior e com menor risco.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Sebastião Timo Iaria e à técnica de Laboratório Rosa Alexandrino de Oliveira, pelo auxílio dispensado na pesquisa de produção de enterotoxinas.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association - Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for microbiological examination. Washington, 1976.
2. Araújo, W.P. - *S. aureus* em leite crú. Produção de enterotoxina e caracterização da origem provável, humana ou bovina, a partir das cepas isoladas. São Paulo, 1984. (Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da USP).
3. Demeter, K.J. - Lactobacteriologia. Zaragoza (Espanha), Acribia, 492p., 1969.
4. Donnelly, C.B.; Leslie, J.E.; Black, L.A. & Lewis, K.H. - Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese. Appl. Microbiol., 15:1382-7, 1967.

5. Furlanetto, S.M.P.; Nader Fº, A.; Wilson, D. & Schocken-Iturrino, R.R. - *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados a partir de leite de vacas mastíticas. Rev. Microbiol., São Paulo, 18(2):138-143, Abr./Jun. 1987.
6. Galbraith, N.S.; Forbes, P. & Clifford, C. - Communicable disease associated with milk and dairy products in England and Wales 1951-80. Brit. Med. J., 284:1761-5, 1982.
7. Harrigan, W.F. & Mc Cance, M. - Laboratory methods in microbiology. 4.ed. New Jersey, Prentice-Hall, 1969.
8. Harrop, M.H.V.; Pereira, L.J.V.; Brito, J.R.F. & Melo, A.M.B. - Incidência da mastite bovina na bacia leiteira da zona meridional agreste, PE. Pesq. Agrop. Bras., 10(8): 65-7, 1975.
9. Iaria, S.T. - *S. aureus* em doces vendidos em padarias e confeitarias do Município de São Paulo. Produção de enterotoxina estafilocócica e fagotipagem a partir das cepas isoladas (1975/1976). São Paulo, 1978. (Tese de Livre-Docência, Instituto de Ciências Biomédicas da USP).
10. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. - Microrganisms in foods. 1. Their significance and methods of enumeration. 2.ed. Toronto, University of Toronto Press, 1978.
11. Kato, E. & Hume, T. - Enterotoxicity of bovine Staphylococci isolated from California Mastitis Test positive milk in Japan, Jap. J. Vet. Res., 28:75-85, 1980.
12. Lachica, R.V.F.; Genigeorgis, C. & Hoeprich, P.D. - Metachromatic agar-diffusion method for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl. Microbiol., 21:585-7, 1971.
13. Minor, T.E. & Marth, F.H. - Staphylococci and their significance in foods. Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford, New York. 1976.
14. Nader Fº, A.; Schocken-Iturrino, R.P. & Rossi Jr., O.D. - Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite tipo B. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot., 35(5):621-30, 1983.
15. Nader Fº, A.; Schocken-Iturrino, R.P. & Rossi Jr., O.D. - Mastite subclínica em rebanhos produtores de leite Gordura 3,2%. Arq. Bras. Med. Vet. Zoot., 36(5):549-58, 1984.
16. Robbins, R.; Read, R.B. & Martin, T.D.N. - Detecting the enterotoxicity of *Staphylococcus aureus* strains. Appl. Microbiol., 28:946-50, 1974.
17. Santos, E.C.; Genigeorgis, C. & Farver, T.B. - Prevalence of *S. aureus* in raw and pasteurized milk used for comercial manufacturing of Brasilian Minas Cheese. J. Food Prot., 44(3):172-6, 1981.
18. Schalm, O.W. & Noorlander, D.D. - Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. J. Amer. Vet. Med. Res., 130(5):199-207, 1957.
19. Schocken-Iturrino, R.P.; Nader Fº, A. Furlanetto, S.M.P. & Rossi Jr, O.D. - Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos em amostras de leite de vacas mastíticas. Ars Veterinaria, 2(1):69-74, 1986.
20. Veissayre, R. - Lactologia técnica. Zaragoza (España), Acribia, 1972.
21. Wilson, D. - Pesquisa de *S. aureus* em leite a ser pasteurizado. Rev. Saúde Publ., São Paulo, 11:1-11, 1977.

COMPARISON OF A DIFFUSION IN GEL-ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (DIG-ELISA) AND THE SYNERGISTIC HEMOLYSIS INHIBITION ASSAY TO RECORD THE ANTIBODY RESPONSE OF GOATS TO THE EXOTOXIN OF CORYNEBACTERIUM PSEUDOTUBERCULOSIS

Recebido para publicação em 22/02/88

Eugene H. Johnson

6107 Heritage Drive
Agoura Hills, California 91301 USA

Carlos Eugenio Soto Vidal
& Janete Santa Rosa

Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos/EMPRAPA
Caixa Postal 10
62100 Sobral CE, Brasil

Summary

A diffusion in Gel-Enzyme Linked Immunosorbent Assay was developed to study the antibody response of goats to the exotoxin of *Corynebacterium pseudotuberculosis*, the causative agent of caseous lymphadenitis. Baseline values are considered for goats infected and non-infected. The results are compared to titers recorded with the Synergistic Hemolysis Inhibition Assay.

Resumo

Comparação de uma Difusão em Gel-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dig-ELISA) com o Ensaio de Inibição de Hemólise Sinergico para registrar a resposta humoral de caprinos a exotoxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis*

Uma difusão em Gel-Enzyme Linked Immunosorbent Assay foi desenvolvida para estudar a resposta humoral caprinos a exotoxina de *Corynebacterium pseudotuberculosis*, o agente causador de linfadenite caseosa. Valores são considerados para caprinos infectados e não infectados. Os resultados são comparados com títulos achados no ensaio de inibição de hemólise sinergico.

Introduction

Caseous lymphadenitis is a common chronic disease of sheep and goats caused by the bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Economic losses are due to external and internal abscesses leading to non-specific wasting, condemnation of organs at slaughter and to rejection of hides.

An Enzyme Linked Immunosorbent Assay has been employed to detect the antibody response in goats to a cell wall antigen and to the exotoxin of *C. pseudotuberculosis* (5, 6). The specificity of the test was demonstrated by its lack of cross reactivity with a cell wall antigen of *C. pyogenes*. The ELISA was shown to be promising in its ability to detect goats naturally and experimentally infected with *C. pseudotuberculosis*. The full sensitivity of the conventional ELISA however can only be fully exploited when the results are recorded spectrophotometrically. Few veterinary laboratories within Brazil are equipped with such elaborate machinery. We thus found it feasible to develop an alternative testing method.

A simplified approach to performing the conventional ELISA is the diffusion in Gel-Enzyme Linked Immunosorvent Assay (Dig-ELISA) as first described by Elwing and Nygren (1). The principle of the Dig-ELISA is based on the ability of antibodies to diffuse through an agar gel and adhere to an antigen coated polystyrene surface. These primary antibodies can then be detected by either a direct method or by using the double sandwich technique (2, 3). Visualization of the reaction is identical for the two methods and is achieved by the application of an agar gel containing an appropriate substrate for the enzyme employed.

In the present paper a Dig-ELISA was developed to record the total serum antibody response to the exotoxin of *C. pseudotuberculosis*. Results are compared to those of the Synergistic Hemolysis Inhibition Assay, a test based on the ability of anti-*C. pseudotuberculosis* serum to neutralize the hemolysis produced by the interaction of *C. pseudotuberculosis* exotoxin and erythrocytes treated with a sterile filtrate of *Corynebacterium equi* broth.

Materials and Methods

Corynebacterium pseudotuberculosis and exotoxin (Dig-ELISA antigen) - A local strain of *C. pseudotuberculosis* isolated in pure culture from an abscessed prescapular lymphnode was used for the preparation of the exotoxin which served as the Dig-ELISA antigen. The bacteria was grown aerobically on agar plates enriched with 5% sheep erythrocytes at 37°C, for 48 hours. Isolated colonies were transferred into a 250ml Erlenmeyer flask containing brain heart infusion broth (BHI). This BHI was incubated at 37°C aerobically for 48 hours and transferred to a refrigerated incubator (8°C) overnight. The supernatant was centrifuged and filtered through a sterile 22μm Millipore filter. This media containing the exotoxin was dialysed against phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2-7.4 and subsequently treated with thimerosal at a concentration of 1:10,000.

Goat sera - Twelve sera were obtained from a single farm with no known history of caseous lymphadenitis and 82 sera were obtained from various farms from goats with external abscesses from which *C. pseudotuberculosis* was isolated. The Dig-ELISA and the Synergistic Hemolysis Inhibition Assay (SHI-Assay) were performed on all sera.

Dig-ELISA - Antigen coating - Ten ml of the Dig-ELISA antigen were used to coat each bacteriological polystyrene petri dish. Adsorption occurred at room temperature for 18-24 hours. The petri dishes were washed three times with distilled water. These antigen coated plates were either used immediately or frozen until needed. To occupy unbound sites on the plates 10ml of a 1% solution of equine serum were added to each plate and allowed to incubate for 30 minutes. This solution was poured off and the plates were washed three times with distilled water.

Antibody coupling phase - Fifteen ml of 1% agarose containing 1% equine serum made up in 0.01 M PBS, pH 7.2-7.4 were added to each dish. Wells, 3mm in diameter were punched into the agar and 12μl of the undiluted serum sample were added. Each dish accommodated nine to ten wells. Plates were then covered and incubated in a humidified jar at 37°C for 18 hours. The gels were then removed and the plates washed three times with PBS, pH 7.2-7.4. Ten ml of PBS, pH 8.0 containing 0.5M NaCl and 0.05% tween 80 (PBS-Tween 80) were added to each dish and incubated at room temperature for 5 minutes and then poured off.

Addition of conjugate and substrate gel - Ten ml of a 1/500 dilution of peroxidase conjugated rabbit anti-caprine immunoglobulins (Dakopatts, Glostrup, Denmark) made up in PBS, pH 7.2-7.4 containing 0.05% Tween 20 was added to each dish. After a two hour incubation period at 37°C. the plates were washed three times with PBS, pH 7.2-7.4 and ten ml of a substrate gel containing 1% agarose, 0.08% p-phenylenediamine HCl (Sigma) and 0.01% H₂O₂ were added to each plate. The diameter of the coloured reaction zones were read with a ruler after 20 minutes at room temperature.

Synergistic Hemolysis Inhibition Assay - This assay was performed as detailed by Knight (4). The endpoint titer was the highest dilution of each serum which gave no evidence of hemolysis surrounding the test disc.

Adsorption of antisera - Sera from animals with SHI-Assay titers of 1:512 or greater were adsorbed by mixing 100 μ l of the serum with 100 μ l of the Dig-ELISA antigen. The mixture was incubated for 2 hours at 37°C and then transferred to a refrigerator for 4 hours.

Results

Primary antigen-antibody reactions in the Dig-ELISA were visualized as dark purple zones surrounded by a clear gel which developed within 10 minutes after the addition of the substrate gel and remained unaltered in size after a 20 minutes incubation period. Identical serums tested on different days showed a maximum variation in reaction zone diameters of 0.5mm.

Table 1 shows the values obtained with the Dig-ELISA and the SHI-Assay of the sera from the 12 non-infected and 82 infected goats. Goats without abscesses had maximum reaction zone diameters of 9.7 \pm 0.6mm and

SHI-titers of 1:2. Animals with caseous lymphadenitis had reaction zone diameters ranging from 11.5 to 18.7mm. All but three goats with caseous lymphadenitis had SHI-titers from 1:4 to 1:1024. Three goats with caseous lymphadenitis had SHI titers of only 1:2.

Adsorption tests removed all serological activity in the Dig-ELISA.

Discussion

In both the Dig-ELISA and the SHI-Assay antibodies against the exotoxin of *C. pseudotuberculosis* are detected. The SHI-Assay is based on the ability of antibodies directed against the exotoxin of *C. pseudotuberculosis* to inhibit the hemolysis produced by its interaction with erythrocytes treated with a sterile filtrate of *Corynebacterium equi* broth.

Table 1 indicates that rising SHI-titers were accompanied by parallel increases in the diameters of the reaction zones in the Dig-ELISA. Animals without external abscesses had maximum reaction zone diameters of 9.7 \pm 0.6. It is most probable that these "background" values are crossreacting antibodies as adsorption tests removed their serological activity. It can be argued however that these animals could have been harbouring internal abscesses and that these are homologous antibodies but this possibility appears remot as the sera from all the negative animals were from a single farm that had no history of caseous lymphadenitis. Also our preliminary data gives a strong indication that animals with internal abscesses caused by *C. pseudotuberculosis* have very strongly positive sera.

Three animals that presented external abscesses from which *C. pseudotuberculosis* was isolated had SHI-titers of only 1:2 whereas these same animals had Dig-ELISA reaction zone diameters of 12.4, 13.6 and 15.4 respectively. These sera were retested and gave identical results. It was thus not totally apparent why the SHI-Assay such a low titer for these goats. It is possible that the animals where

Table 1 - Comparison of the Dig-ELISA and the SHI-Assay.

Symbols: a = Mean \pm standard error; * = Three goats with caseous lymphadenitis had SHI-titers of only 1:2.

Diameter of reaction zones (mm) ^a	Goats with caseous lymphadenitis	Total * of sera (Dig-ELISA)	Titer in SHI-Assay
9.4 (+/- 0.5)	0	9	1:1
9.7 (+/- 0.6)	0*	3	1:2
11.5 (+/- 0.8)	10	10	1:4
12.8 (+/- 0.6)	10	10	1:8
13.4 (+/- 0.8)	10	10	1:16
13.8 (+/- 0.6)	10	10	1:32
14.7 (+/- 0.5)	10	10	1:64
15.2 (+/- 0.4)	10	10	1:128
16.2 (+/- 0.6)	10	10	1:256
17.4 (+/- 0.7)	7	7	1:512
18.3 (+/- 0.7)	5	5	1:1024

tested at a time in which their titers were just beginning to rise. It would have thus been desirable to have retested these animals in order to compare the new values with the initial titers. Unfortunately this was not possible. The other possibility is that the Dig-ELISA was actually able to detect smaller quantities of anti-exotoxin antibodies and represented a more sensitive serological assay. It is interesting to note that when these three sera were tested with the Dig-ELISA using the double sandwich technique to typify the individual IgG and IgM responses (unpublished data), both isotypes gave consistently high positive results. Besides for the fact that the Dig-ELISA gave superior results in clearly defining positive animals it was also simpler to perform and more appropriate for the conditions of our laboratory. The sensitized blood agar plates used in the SHI-Assay could not be stored for long periods of time without problems of contamination and the strains of *C. equi* that we had preserved began to lose their ability to produce adequate amounts of toxin to sensitize the erythrocytes used in this assay.

Of major concern to a small scale veterinary laboratory is the fact that the Dig-ELISA is considerably cheaper to perform than the conventional ELISA. Most of the reagents are readily available within Brazil. Bacteriological polystyrene petri dishes can be found easily and are much cheaper than conventional ELISA plates. Enzyme conjugated antibodies can be produced in most instances with the collaboration of larger laboratories of biochemistry or immunology. The Dig-ELISA has the advantage of simplicity and suitability for analysis and screening of large numbers of sera and the test can be scaled up or down to suit the needs of each individual laboratory. As the diameter of the reaction zones are proportional in size to the concentration of the antigen specific antibodies there is no need to carry out tiresome dilution series. The antigen used for coating the polystyrene dishes can be reused a number of times without apparent loss of sensitivity. Also, the peroxidase conjugated antibody solutions can be reutilized several times after their recovery from the petri dishes with no apparent loss in sensitivity (unpublished data). This makes the test economical to perform. Finally, after a twenty minute incubation period the diameter of the Dig-ELISA reaction zones did not change, thus unlike in the conventional ELISA the time for reading the endpoints is not critical after the time of development of the maximum diameter of the reaction zones has been established.

In conclusion, the Dig-ELISA appears to be a simple and sensitive assay to detect the antibody response of goats to the exotoxin of *C. pseudotuberculosis*. Field tests presently underway will determine its usefulness to detect animals with subclinical infections and internal abscesses.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Title XII grant of the Small Ruminant Collaborative Support Program of the United States Agency for International Development.

The authors thank Jose Brito Leite, technician, Laboratory of Bacteriology and Maia Osmarilda Machado, technician, Laboratory of Immunology of the CNPC for their technical assistance.

References

1. Elwing, H. & Nygren, H. - Diffusion in gel-enzyme linked immunosorbent assay (Dig-Elisa): a simplified method for the quantification of class specific antibodies. *J. Immunol. Methods* 31:101-107, 1979.
2. Johnson, E.H., Smith, B.P. & Reina-Guerra, M. - Diffusion in gel-enzyme linked immunosorbent assay (Dig-Elisa) to record the immunoglobulin response of calves vaccinated with *Salmonella*. *Vet. Microb.*, 10:71-86, 1984.
3. Johnson, E.H., Oliveira, S.C., Ribeiro, O.C., & Haga da Silva, J.A. - Serological detection of abscesses caused by *Corynebacterium pseudotuberculosis* using the Dig-Elisa. *Proc. of the IV Intl. Conf. on Goats. Brasilia, Brazil*, 2:1358, 1987.

4. Knight, H.D. - A serological method for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in horses. Cornell Vet., 68:220-237, 1978.
5. Shen, D.T., Jen, L.W. & Gorham, J.R. - The detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* antibody in goats by the enzyme linked immunosorbent assay. Proc. Intl. Goat. Prod. and Disease. Arizona, USA., 445-448, 1982.
6. Sutherland, S.S., Ellis, T.M., Mercy, A.R., Patton, M. & Middleton, H. - Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection in sheep. Aust. Vet. J., 64:263-266, 1987.

MYCOPLASMA HOMINIS E UREAPLASMA UREALYTICUM: PESQUISA NO MATERIAL CERVICAL DE GESTANTES

Regina Ayr Florio da Cunha
 & Kicko Takei

Recebido para publicação em 15/03/88

Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP
 Caixa Postal 30786
 São Paulo SP, Brasil

Sueko Takimoto

Deptº de Virologia
 Instituto Adolfo Lutz

& Marilena Cury

Deptº de Ginecologia e Obstetrícia
 Faculdade de Medicina da USP

Resumo

Foram feitas pesquisas de *Mycoplasma hominis* e de *Ureaplasma urealyticum* em material cervical de gestantes. A identificação de *Ureaplasma urealyticum* baseou-se nas provas bioquímicas das atividades da urease e da fosfatase e na observação da morfologia colonial característica. *Mycoplasma hominis* foi caracterizado pela observação da morfologia colonial de "ovo-frito", pelo comportamento bioquímico frente às seguintes provas: utilização da arginina, determinação da atividade da fosfatase, redução do tetrazólio em aerobiose e anaerobiose, utilização da glicose, produção de filmes e "spots", e foi identificado sorologicamente através das reações de inibição metabólica e de imunodifusão dupla. Todos os micoplasmas isolados foram inicialmente submetidos à prova de sensibilidade à digitonina, 1,5% em solução alcoólica, antes de serem submetidos às provas de identificação. Dois grupos de gestantes foram estudados: grupo de risco, constituído de 37 gestantes que possuíam histórico anterior de alterações perigestacionais tais como: abortos, natimortos, prematuros, etc... e grupo controle constituído por 37 gestantes com gestações anteriores normais. As taxas de colonização encontradas foram: 73,0% de *Ureaplasma urealyticum* e 21,6% de *Mycoplasma hominis* no grupo de risco; no grupo controle os resultados foram: 65,0% de *Ureaplasma urealyticum* e 16,2% de *Mycoplasma hominis*. Estatisticamente as diferenças entre os dois grupos não foram significantes ($\alpha = 5\%$).

Summary

Mycoplasma hominis and *Ureaplasma urealyticum*: research in pregnant cervical mucus specimens

This presence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* was studied in cervical mucus of pregnant women. The identification of *Ureaplasma urealyticum* was based in the biochemical tests as the activities of urease and phosphatase, and by the observation of colonial morphology. The characterization of *Mycoplasma*

hominis was done by the typic colonial of "friel-egg" and by the biochemical profile of arginine utilization; phosphatase activity; tetrazolium reduction in aerobiosis and anaerobiosis; glucose utilization and production of films and spots. The final identification was came about by metabolic inhibition and double immunodiffusion tests with specific antiserum. Before the identification every mycoplasmas were tested by the sensibility to digitonin. Two groups of pregnant women were studied: the group of risc was composed by 37 pregnant that had had abortions, malformed children, stillborns, prematures or other gestacional problems, etc.. and the group control composed by 37 pregnant without history of gestacional problems. The rates of colonization in the group of risc were 73,0% of *Ureaplasma urealyticum* and 21,6% of *Mycoplasma hominis*, and in the group control were 65,0% of *Ureaplasma urealyticum* and 16,2% of *Mycoplasma hominis*. The difference between these two groups were not statistically significant ($\alpha = 5\%$).

Introdução

A grande dificuldade no isolamento, cultivo e caracterização dos micoplasmas foi evidenciada desde 1882 por Louis Pasteur, o primeiro a reconhecer que a pleuropneumonia bovina (doença respiratória grave que atingia rebanhos inteiros com altos índices de mortalidade), era causada por um microrganismo incomum (25). Tal agente não podia ser observado através da microscopia usual e tão pouco se desenvolvia nos meios nutricionais empregados rotineiramente em Bacteriologia (11, 16). Seu intenso polimorfismo ficou evidenciado em 1910 por Bordet, Borrel & Cols. com o auxílio do ultramicroscópio e seu cultivo em meio livre de células só foi conseguido em 1923 por Bridé & Donatién (3, 4, 8). A partir daí, muitos micoplasmas foram isolados de animais, até que em 1962 Chanock & Cols. conseguiram o cultivo de *Mycoplasma pneumoniae*, agente etiológico da pneumonia atípica primária humana (6).

Posteriormente, vários outros micoplasmas foram isolados do homem e caracterizados, principalmente os associados com o trato geniturinário.

Muito questionado tem sido seu envolvimento nas chamadas "falhas da reprodução humana" tais como abortos, natimortos, mal-formados, etc..., (5, 7, 9, 10) e portanto este trabalho teve como proposição além do isolamento e identificação dos micoplasmas genitais, verificar as taxas de colonização de *Mycoplasma hominis* e de *Ureaplasma urealyticum* no cervix de gestantes. Devido ao fato do próprio estado gestacional tornar as gestantes um grupo bastante suscetível às infecções microbianas, a colonização micoplásnica tem sua grande importância na possível patogenia das alterações perigestacionais.

Material e Métodos

A amostra clínica utilizada foi material cervical colhido com auxílio de "swabs" alginatados neutros, da região denominada fundo de saco de Douglas. As gestantes estudadas tiveram acompanhamento clínico ambulatorial da Clínica Obstétrica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP. Estas foram divididas em dois grupos constituídos por 37 gestantes: um grupo de risco do qual faziam parte pacientes com histórico de alterações gestacionais e um grupo controle constituído por mulheres com gestações anteriores normais.

Os meios empregados foram:

1. **Meio líquido de transporte (MITr)** - Utilizado no transporte das amostras clínicas e foi baseado no meio A3xb de Shepard & Lunceford (27) com algumas modificações tais como: as introduções da anfotericina B na concentração de 2,5 μ g/mL, da penicilina G potássica na concentração de 1.000 U.I./mL e da fração de soro, em substituição à albumina bovina a 30%.

2. Meio sólido - Para isolamento e observação da morfologia colonial dos micoplasmas (meio A₇ de Shepard & Lunceford (27)).

3. Meio líquido de arginina (MLA) - Empregado na verificação da utilização da arginina, modificado do originalmente descrito pelo IDMI (24); este meio teve suprimido da formulação original a polimixina, a anfotericina B e a eritromicina e foi adicionado de suplemento VX na concentração de 1mL %.

4. Meio líquido - Utilizado para o cultivo de *Ureaplasma urealyticum* e para a determinação da atividade da urease (meio U₁₀ descrito por Shepard (26)).

5. Meio líquido utilizado para a determinação da glicose (MLG) - (Meio preconizado por Aluotto & Cols. (1)).

6. Meio sólido para a determinação da atividade da fosfatase (MSAF) - Meio baseado no descrito por Aluotto & Cols. (1) e que teve como modificações do meio original, a substituição da fenolftaleína difosfato de sódio pelo p-nitrofenilfosfato a 1,7% (0,5mL%) e a introdução do suplemento VX (1,0mL%).

7. Meio Sólido para redução do tetrazólico (MSRTZ) - Segundo Aluotto & Cols. (1).

8. Meio sólido utilizado para a detecção da formação de filmes e "spots" - (Meio MSFFS, descrito por Freundt (13)).

Todos os micoplasmas isolados foram submetidos à prova de sensibilidade a digitonina a 1,5% em solução alcoólica (14).

Foram ainda empregadas as reações de imunodifusão dupla de Ouchterlony (20) e de inibição metabólica (22) na identificação final de *Mycoplasma hominis* utilizando-se soro imune anti *Mycoplasma hominis* obtido através da imunização de coelhos com a cepa padrão de *Mycoplasma hominis* ATCC 23.114.

Resultados e Discussão

A identificação dos micoplasmas isolados das amostras clínicas foi feita de acordo com as características morfológicas e bioquímicas apresentadas na Tabela 1.

Ureaplasma urealyticum pode ser identificado bioquimicamente pela capacidade de hidrolizar a uréia, com produção de amônia e pela morfologia colonial característica, o que está de acordo com os trabalhos de Dische & Cols. (10), Foy & Cols. (12) e Bidet & Minck (2).

Mycoplasma hominis teve sua caracterização definida através das reações de imunodifusão dupla e de inibição metabólica.

Quanto às taxas de colonização verificadas nos dois grupos estudados, estas foram: *Ureaplasma urealyticum* foi isolado de 73% das 37 gestantes constituintes do grupo de risco e de 21,6% delas, isolamos *Mycoplasma hominis*, perfazendo um total de 94,6% isolamentos de micoplasmas. No grupo controle os índices de isolamento foram de 65,0% de *Ureaplasma urealyticum* e 16,2% de *Mycoplasma hominis* no total de 81,2% de isolamentos de micoplasmas. Tais diferenças estatisticamente não foram significantes. De 62 gestantes, do total de 74 estudadas, foi possível coletar dados quanto aos resultados das gestações que estavam em curso. Tais resultados podem ser observados na Tabela 2.

Foi verificado que 11 gestações (30,5%) terminaram anormalmente no grupo de risco, sendo que *Ureaplasma urealyticum* foi isolado de 4 pacientes (11,1%) que não possuíam quaisquer alterações clínicas que as justificassem. Todavia, tanto *Ureaplasma urealyticum* quanto *Mycoplasma hominis* foram também isolados de pacientes que deram à luz conceitos normais.

A proporção de micoplasmas isolados no presente estudo, 69,0% de *Ureaplasma urealyticum* e 19,0% de *Mycoplasma hominis* no total de gestantes, foram concordantes com os resultados observados por Harrison & Alexander (15) e Majori & Cols. (20) os quais trabalhando com grupos e amostras clínicas semelhantes obtiveram: 72,3% de isolamento de *Ureaplasma urealyticum*, 23,5% de *Mycoplasma hominis*; e 76,7% de

Tabela 1 - Características morfológicas e bioquímicas dos micoplasmas isolados de amostras clínicas.

Símbolos: *T = Colônias diminutas apresentando coloração Marrom dourado; S = Sensível; (-) = Negativo; (+) = Positivo.

Micoplasmas isolados Características	<i>Ureaplasma urealyticum</i>	<i>Mycoplasma hominis</i>
Morfologia colonial no meio MSM	Colônias "T" *	Colônias com aspecto de "ovo-frito"
Sensibilidade à digitonina	S	S
Metabolização da glicose	-	-
Hidrólise da arginina	-	+
Prova de atividade da urease	+	-
Prova de atividade da fosfatase	+	-
Produção de filmes e "spots"	-	-
Produção de tetrazólio em ae/an	-/-	-/-

Tabela 2 - Dados sobre o produto conceptual nos grupos estudados.

Símbolos: - = Resultados das gestações que estavam em curso; grupo de risco e controle; (?) = Não há registro; (*) = São considerados prematuros os nascidos com menos de 37 semanas.

Resultado da gestação Gestantes	RN normal	Abortos	Natimortos	Malformados	Prematuros*	Total
grupo de risco	25	2	2	1	6	36
grupo controle	26	?	?	?	?	26

Ureaplasma urealyticum e 11,7% de *Mycoplasma hominis*, respectivamente. Tais resultados demonstraram que a metodologia por nós utilizada foi eficiente.

No que se refere às taxas encontradas no grupo controle, *Ureaplasma urealyticum* foi detectado em 18 pacientes (48,6%); *Mycoplasma hominis* isoladamente não foi encontrado em nenhum (0,0%), enquanto que a presença simultânea de *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* foi observada em 6 casos (16,2%). Foi ainda verificada uma taxa de 30,5% de gestações terminadas anormalmente no grupo de risco, enquanto que no grupo controle nenhum caso semelhante foi observado.

Esses resultados diferem daqueles encontrados por Kundsin & Driscoll (18) que, utilizando o mesmo tipo de material clínico (material cervical) e meios de cultivo análogos aos utilizados no presente estudo (meio de Hayflick & Chanock (16) para micoplasmas clássicos e meio de Shepard (26) para *Ureaplasma urealyticum*), encontraram 67% de positividade para micoplasmas no grupo de risco e 48% no grupo controle. Desse total, *Ureaplasma urealyticum* foi isolado em 42,5% dos casos, *Mycoplasma hominis* em somente 1,8% dos casos e o encontro simultâneo de ambos foi verificado em 22% dos pacientes do grupo de risco. No grupo controle, os resultados foram: em 28,0% das pacientes foi isolado *Ureaplasma urealyticum* enquanto que *Mycoplasma hominis* foi encontrado em 6,0% e ambos em 14,0%. Além disso, os autores

verificaram que 42,0% das gestações do grupo de risco e 23,0% daquelas do grupo controle terminaram anormalmente. Diante desses resultados, sugeriram um provável envolvimento dos micoplasmas como patógenos nos casos de gestações anormais.

No presente trabalho, contudo, não foi possível inferir nada a respeito da patogenicidade desses microrganismos, uma vez que as taxas de incidência nos grupos de risco e controle não foram estatisticamente significantes. Se as pesquisas fossem voltadas para a sorotipagem das cepas isoladas de *Ureaplasma urealyticum* alguns aspectos do real papel patogênico desses microrganismos, poderiam talvez ser elucidados. Lin & Cols. (19), nos EUA, estudando micoplasmas genitais humanos, verificou a presença de mais de um sorotipo de *Ureaplasma urealyticum* em uma única amostra clínica. Kapur & Singh (17) também pressupuseram, devido às variações entre sintomatologia clínica e o isolamento de micoplasmas, haver cepas de *Ureaplasma urealyticum* com diferentes graus de virulência. E finalmente, Quinn & Shenchuk (23), com seus estudos realizados no Canadá sobre evidência sorológica de *Ureaplasma urealyticum* nas infecções em mulheres com histórico de aborto espontâneo, observaram que, certos sorotipos de *Ureaplasma urealyticum* poderiam ser mais patogênicos do que outros. Em vista disso, há uma grande necessidade de que se prossigam as pesquisas destes microrganismos, aqui no Brasil tão pouco estudados, abordando melhor os aspectos antigenicos e imunogênicos, contribuindo dessa forma para a determinação dos vários sorotipos.

Referências Bibliográficas

1. Aluotto, B.B.; Wittler, R.G.; Willians, C.O. & Faber, J.E. - Standardized bacteriologic techniques for the characterization of *Mycoplasma* species. Int. J. Syst. Bacteriol., Washington, 20:35-38, 1970.
2. Bidet, F. & Minck, R. - Recherche de mycoplasmes T chez lez accouchées. Nouv. Presse Med., Paris, 7(10):851, 1978.
3. Bordet, J. - La morphologie du microbe de la péripneumonie des bovidés. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 24:161-7, 1910.
4. Borrel, Dujardin-Beaumetz; Jeantet & Jouan - Le microbe de la péripneumonie. Ann. Inst. Pasteur, Paris, 24:168-7, 1910.
5. Caspi, E.; Solomon, F. & Sompolinsky, D.B.V.M. - Early abortion and mycoplasma infection. Isr. J. Med. Sci., Jerusalém, 8:122-7, 1972.
6. Chanock, R.M.; Hayflick, L. & Barile, M.F. - Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Washington, 48:41-9, 1962.
7. Christensen, K.K.; Hågerstrand, I. & Mardh, P. - Late spontaneous abortion associated with *Mycoplasma hominis* infection of the fetus. Scand. J. Infect. Dis., Stockholm, 14(1):73-4, 1982.
8. Dienes, L. - Cultivation of pleuropneumonia-like organisms from female genital organs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., New York, 44:468-9, 1940.
9. Dimusto, J.C.; Bohjalian, O. & Millar, M. - *Mycoplasma hominis* type I infection and pregnancy. Obst. Gynecol., Amsterdam, 41:33-7, 1973.
10. Dische, M.R.; Quinn, P.A.; Czegledy-Nagy, E. & Sturgess, J.M. - Genital mycoplasma infection intrauterine infection: pathologic study of the fetus and placenta. Am. J. Clin. Pathol., Philadelphia, 72:167-74, 1979.
11. Edward, D.G.H. - The pleuropneumonia group of organisms: a review, together with some new observations. J. Gen. Microbiol., Colchester, 10:27-64, 1954.
12. Foy, H.; Kenny, G.; Bor, E.; Hammar, S. & Hickman, R. - Prevalence of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* (T strains) in urine of adolescents. J. Clin. Microbiol., Washington, 2(3):226-30, 1975.
13. Freundt, E.A. - Film and spot production. In: Razin, S. & Tully, J.G., eds. Methods in mycoplasmatology. New York, Academic Press, v.1., p.373-4, 1983.
14. Freundt, E.A. & Andreus, B.E. - The sensitivity of *Mycoplasmatales* to Sodium Polyanethol - Sulfonate and Digitonin. Zentralbl. Bacteriol. Microbiol., Hyg. Abt. 1 Drig. A. 222:104-12, 1973.
15. Harrison, H.R. & Alexander, E.R. - Cervical *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmal infections in pregnancy. JAMA J. Am. Med. Assoc., Chicago, 250(13):1721-7, 1983.

16. Hayflick, L. & Chanock, R. - Mycoplasmas species of man. *Bacteriol. Rev.*, 29(2):185-221, 1965.
17. Kapur, T.R. & Singh, O.P. - Isolation of T-mycoplasma (*Ureaplasma urealyticum*) from the genitourinary tract. *J.: Indian. Med. Assoc., Calcutta*, 70(5):101-3, 1978.
18. Kundsin, R.B. & Driscoll, S.G. - Mycoplasma and human reproductive failure. *Surg. Gynecol. Obstet., Chicago*, 131:89-92, 1970.
19. Lin, J.S.L.; Radnay, K. & Kendrick, M.T. - Serologic studies of human genital mycoplasmas: distribution of titers of mycoplasmacidal antibody to *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in pregnant women. *J. Infect. Dis., Chicago*, 137(3):266-72, 1978.
20. Majori, L.; Campello, C.; Mandruzzato, G.P. & Sapuio, P. - L'epidemiologia delle micoplasmosi. Nota III. Micoplasmosi genitale in gravidanza e transmisione neonatale. *Boll. Inst. Sieroter. Millan*, 53(3):515-24, 1974.
21. Ouchterlony, O. - Antigen-antibody reation in gels. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B.; Microbiol., Copenhagen*, 26:507-15, 1949.
22. Purcel, R.H.; Taylor-Robinson, D.; Wong, D.C. & Chanock, R.M. - A color test for the measurement of antibody to the non-acid-forming human mycoplasma species. *Am. J. Epidemiol., Baltimore*, 84:51-66, 1966.
23. Quin, P.A. & Shenchuk, A.B. - Serologic evidence of *Ureaplasma urealyticum* infection in women with spontaneous pregnancy loss. *Am. J. Obstet. Gynecol., St. Louis*, 145:245-9, 1983.
24. Razin, S. & Tully, T.G. - Colesterol requirement of Mycoplasmas. *J. Bacteriol., Baltimore*, 102:306-10, 1970.
25. Sabin, A.B. - The filtrable microorganisms of the pleuropneumonia group. *Bacteriol. Rev., Washington*, 5(1):1-66, 1941.
26. Shepard, M.C. - Standard fluid medium U₁₀ for cultivation and maintenance of *Ureaplasma urealyticum*. *Int. J. Syst. Bacteriol., Washington*, 24:160-71, 1974.
27. Shepard, M.C. & Lunceford, C.D. - Diferencial agar medium (A₇) for identification of *Ureaplasma urealyticum* (Human T Mycoplasma) in primary cultures of clinical material. *J. Clin. Microbiol., Washington*, 3(6):613-25, 1976.

ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITIES AND PHAGE TYPING OF HOSPITAL AND NON-HOSPITAL STRAINS OF METHICILIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS ISOLATED FROM HANDS

Celso Luiz Cardoso

Recebido para publicação em 18/03/88

Deptº de Farmácia e Bioquímica
Universidade Estadual de Maringá
Caixa Postal 331
87001 Maringá PR, Brasil

Lúcia Martins Teixeira
& Paulo P. Gontijo Filho

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

Summary

Hand carriage of methicillin-resistant *S. aureus* by hospital and control individuals was studied. Four subgroups of 5 individuals were sampled by the plastic-bag technique at weekly intervals during 4 weeks. A total of 480 samples was collected. Among 349 staphylococci strains recovered, 19/105 (18.09%) and 20/244 (8.19%) were isolated from individuals belonging, respectively, to the intra and extra-hospital groups, and were identified as *S. aureus*. All *S. aureus* strains produced beta-lactamases and most of them (35/39; 89.74%) were resistant to methicillin. Fifteen distinct phage types were isolated. Most of them belonged to the phage group III. The results showed that methicillin-resistant *S. aureus* strains are frequently found colonizing the hands and emphasize the possible role of the hands as source or route in disseminating those microorganisms.

Resumo

Susceptibilidade a antimicrobianos e fagotipagem de amostras hospitalares e não hospitalares de Staphylococcus aureus resistentes a meticilina, isoladas das mãos

Foi realizado um estudo comparativo sobre o carreamento de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina pelas mãos de indivíduos pertencentes a um grupo intra-hospitalar e aqueles pertencentes a um grupo extra-hospitalar (grupo controle). Empregando-se a técnica do saco plástico, quatro subgrupos de 5 indivíduos foram analisados, a intervalos semanais, durante 4 semanas. Entre as 349 amostras de estafilococos obtidas, 19/105 (18.09%) e 20/244 (8.19%) foram isoladas a partir das mãos de indivíduos pertencentes, respectivamente, aos grupos intra e extra-hospitalar e foram identificadas como *S. aureus*. Foi verificado que todas as amostras de *S. aureus* produziram beta-lactamas e a maioria (35/39; 89,74%) se apresentou resistente a meticilina. Quinze diferentes fagotipos foram identificados, sendo a maioria incluída no fagogrupo III. Os resultados demonstraram que

amostras de *S. aureus* resistentes a meticilina são frequentemente encontradas nas mãos e enfatizam o possível papel das mãos como fonte ou via de disseminação desses microrganismos.

Introduction

Staphylococcus aureus remains an important hospital pathogen accounting for 15% to 20% of all nosocomial infections (3, 6, 17). The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as agent of these infections has been recognized by several investigators (4, 11, 18, 22, 27, 30, 31) in different countries, and has become a serious problem in the last few years. Colonized and infected patients, as well as hospital personnel, and the inanimate hospital environment are considered to be reservoirs for MRSA. Contaminated hands of health care personnel are reported as major route for the spread of these infections (28). However, particularly in Brazil, little has been investigated about the carriage and dissemination of MRSA through contaminated hands. The purpose of this study was to assess the carriage of MRSA on hands of individuals of both hospital and general population.

Material and Methods

By using a modification of Gaschen's (10) plastic-bag technique we collected a total of 480 samples from hands of nursing personnel (groups of 10 individuals) at the University Hospital of the Federal University, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and a group of 10 control individuals not involved in medical care services.

The extra-hospital group (EHG) was composed by two subgroups of 5 volunteers. These subgroups were composed by teaching staff (EHG1) and other employees (EHG2) of the Federal University. The intra-hospital group (IHG) was also composed by two subgroups: IHG3 and IHG4 including nursing staff from, respectively, pediatric wards (semi-critical area) and intensive care unit (critical area) at the University Hospital.

All samples were obtained both before and after handwashing. In this work the former was considered as representative of the transient flora and the latter as representative of the resident flora. Each sampling was represented by three collects performed in the same day at about 8:00 am, 13:00 and 18:00 pm. Thus, from each individual 3 samples were taken from transient and 3 other samples from resident flora. Samples were taken once a week during four weeks from each subgroup of individuals.

For transient flora studies, each individual placed each hand, one after the other in a 150 x 300 x 0.05mm polyethylene bag (Sucaplas, São Paulo, SP, Brazil) sterilized by exposition to ethylene oxide, which contained 10ml of 1,0% coconut soap suspension in phosphate buffer (PBS) pH 7.0. The fingers and palm of each hand were rubbed for 15 seconds in the suspension.

In order to remove superficial transient flora for resident flora analysis, the individuals washed their hands with coconut soap and water (social washing) and dried them on sterilized paper towels. The sampling was performed as above described except that the fluid of sampling was composed by 10ml of trypticase soy broth (BBL Microbiology System, Cockeysville, MD, USA) containing 1.0% sodium thiosulphate (E. Merck, Darmstadt, Germany), 0,5% soy lecithin (Sambra, Ponta Grossa, PR, Brazil), and 1.0% Tween 80 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Amounts of 0.1ml taken from each sampling suspension were plated on mannitol salt agar and trypticase soy agar (BBL). Staphylococci strains were characterized by catalase and coagulase production (9) and anaerobic growth in a glucose-containing medium (8).

Isolates identified as *S. aureus* were tested for antimicrobial agents susceptibility by standard disk diffusion method (20). Additionally, all *S. aureus* strains were tested for beta-lactamase production by the chromogenic cephalosporin technique (29).

Phage typing of *S. aureus* isolates was performed at the Microbiology Department, Ribeirão Preto Medical School, São Paulo University, Ribeirão Preto, SP. *S. aureus* strains were tested with the international set of *S. aureus* phages: Group I - 29, 52, 52A, 79 and 80; Group II - 3A, 3C, 55 and 71; Group III - 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84 and 85; Non-classified - 81, 94, 95 and 96. Experimental phages (86, 88, 89, 90, 92, D11 and HK2) and extra phages (42D and 187) were also included. Typing was performed at routine test dilutions and 100 times routine test dilutions (2).

Results

Among the 349 staphylococci strains recovered, 19/105 (18.08%) and 20/244 (8.19%) were isolated from individuals belonging, respectively, to the intra and extra-hospital groups, and were identified as *S. aureus*. Mannitol salt agar yielded 33 of the 39 (84.41%) *S. aureus* strains isolated.

Table 1 lists those 39 strains according to the sources: 4 out of the controls and 6 out of the 10 hospital individuals were found to harbour *S. aureus* on the hands. Individuals numbers 101 and 106 (control), 114 and 116 (hospital group) yielded a higher frequency of *S. aureus* isolates. About 80% (32/39) of the *S. aureus* isolates were derived from resident flora, i.e., they were recovered from samples collected after handwashing.

The results of the antimicrobial susceptibility tests are shown on Table 2. All the strains were susceptible to vancomycin and lincomycin, resistant to penicillin G and ampicillin, and produced beta-lactamases. Most of them (35/39; 89.74%) were found to be resistant to methicillin, and were therefore considered to be resistant to cephalosporins. *S. aureus* strains numbers 192 and 193 were only susceptible to vancomycin and lincomycin.

Table 3 shows the results of the phage typing. Of the 39 strains tested, 37 (94.87%) were typable. The occurrence of 15 phage types (designated by letters A to O) was observed. Most of them belonged to phage group III. Individuals of the hospital group yielded a higher diversity of phage types (F to O).

Table 1 - Strains (39) of *S. aureus* isolated from the hands (transient and resident flora) of individuals belonging to the extra and intrahospital groups^a.

Symbols: a = Groups of 10 individuals. Each group was composed by 2 subgroups of 5 individuals. b = Four samples were collected at weekly intervals. Each sample was composed by triplicates of both transient and resident microfloras; c = Transient flora; d = Resident flora; e = Extra-hospital group (subgroup 1); f = Extra-hospital group (subgroup 2); g = Intra-hospital group (subgroup 3); h = Intra-hospital group (subgroup 4).

Group Analysed	Strain Number	Sampling Week ^b	Sample's Source	Individual's Number
EHG1 ^e	901	1 st	2 nd TF ^c	101
	902	1 st	2 nd RF ^d	
	948, 949	2 nd	1 st RF	
	951-954	2 nd	2 nd RF	
	957-959	2 nd	3 rd RF	
	996	3 rd	1 st RF	
EHG2 ^f	1099	1 st	1 st RF	106
	1102	1 st	2 nd RF	
	1108	1 st	3 rd RF	
	1177	2 nd	3 rd RF	
EHG2	1314	4 th	1 st RF	108
EHG2	1265	3 rd	2 nd RF	109
	1271, 1272	3 rd	3 rd RF	
IHG3 ^g	90	2 nd	3 rd RF	111
	192, 193	3 rd	1 st TF	
IHG3	74, 75	1 st	3 rd RF	112
	113	2 nd	1 st RF	
IHG3	330	4 th	1 st TF	113
	332, 334	4 th	1 st RF	
	336	4 th	2 nd TF	
	339	4 th	2 nd RF	
	342	4 th	3 rd RF	
	729, 730	2 nd	1 st TF	
IHG4 ^h	835	4 th	1 st RF	116
	842, 843	4 th	3 rd RF	
	891, 892	4 th	3 rd RF	

Discussion

Several techniques have been developed for studying the bacterial flora of hands. The contact or impression plate, the swab and the glove hand or sterile bag techniques are appointed by Larson & Col. (15) as the most commonly used. The

Table 2 - Source and antimicrobial susceptibilities of 39 *S. aureus* strains isolated from the hands of 1 individual belonging to EHG1^a, 3 individuals belonging to EHG2^b, 4 to IHG3^c, and 2 to IHG4^d.

Symbols: a = Extra-hospital group (subgroup 1: individuals 101-105); b = Extra-hospital group (subgroup 2: individuals 106-110); c = Intra-hospital group (subgroup 3: individuals 111-115); d = Intra-hospital group (subgroup 4: individuals 116-120); e = PN-Penicillin, AP-Ampicillin, DP-Methicillin, CD-Cephalothin, CT-Cefoxitin, EI-Erythromycin, VC-Vancomycin, ST-Sulphamethoxazole-Trimethoprim, CO-Chloramphenicol, LN-Lincomycin, AM-Amikacin, GN-Gentamicin, KN-Kanamycin, and TT-Tetracycline; R= Resistant; S = Susceptible.

Individual's Number	Strain Number	Antimicrobial agents ^e												
		PN	AP	DP	CD	CP	EI	VC	ST	CO	IN	AM	GN	KN
101	901,902,948,949 951-954,957-959 996	R ^f	R	R	S ^g	S	S	S	S	S	S	S	S	S
106	1099,1108,1177 1102	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
108	1314	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
109	1265 1271,1272	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
111	90	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
112	192,193	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R
113	74,75,113 330	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
114	332,334,336 339,342	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
116	729,730 835 842,843	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
120	891,892	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

plastic-bag technique described by Gaschen (10) is a modification of the classic Price's basin technique and permits a quantitative and qualitative determination of bacterial flora of hands. We decided to use the plastic-bag technique due to both the facility for collection and transportation of the material and because it allows sampling of the entire hand.

Although the carriage of pathogenic or opportunistic microorganisms by hands is still a very controversial matter we considered the presence of MRSA strains with the same phage type in two or more samplings from resident flora on the hands as transient carriage. An intermittent carrier was defined as an individual from whom *S. aureus* was isolated from hands by the plastic-bag technique on at least one occasion. Larson (14) reported as hand colonization the presence of the same species of Gram-negative bacilli in a minimum of three out eight, or of 40% out three or more samples taken over a minimum period of time of two weeks.

Hand carriage of *S. aureus* strains by control individuals was more frequent among those belonging to subgroup EHG2 (3 of 5, 60%) than those from EHG1 (1 of 5, 20%). Among other possible factors, this differences could be attributed to their professional activities and socio-economic status.

Four out 5 (80%) individuals of pediatric wards (semi-critical area) and 2 out 5 (40%) of those belonging to intensive care unit (critical area) yielded *S. aureus* isolates. The lower contamination level of hands, found in the latter group of individuals, may be related to a higher frequency of handwashing and aseptic

Table 3 - Source and phage typing of 39 *S. aureus* isolated from the hands of 1 individual belonging to EHG1^a, 3 individuals belonging to EHG2^b, 4 to IHG3^c, and 2 to IHG4^d.

Symbols: a = Extra-hospital group (subgroup 1); b = Extra-hospital (subgroup 2); c = Intra-hospital group (subgroup 3); d = Intra-hospital group (subgroup 4); e = Identical strains were designated by the same letter; f = Non-classified; g = Non-typable; h = Experimental.

Individual's Number	Strain Number	Phage type	Phage Group	Identity ^e
101	901,902	6/42E/77/84/+	III	A
	948,951-954			
	949,957-959	6/42E/53/83A/84/95/+	III+Nc ^f	A
106	996	6/42E/84/+	III	A
	1102	6/42E/53/81/+	III+Nc	B
	1108	6/42E/81/+	III+Nc	B
	1177	6/42E/+	III	B
	1099	42E/+	III	B
108	1314	6/54	III	C
109	1265	N.T. ^g	N.T.	D
	1271,1272	85	III	E
111	90	42E	III	F
112	192	N.T.	N.T.	G
	193	85	III	E
113	74,75,113	3A	II	H
114	330,339	84/+	III	I
	332,334,336	3A	II	H
	342	86	Ex ^g ^h	J
116	729	29/52/52A/79/80/81/6/	I+III+Nc	K
		42E/54/77/84/85/95/+		
	730	84/81/96	III+Nc	L
120	835,842,843	95	Nc	M
	891	29/52/52A/80/+	I	N
	892	29/52/52A/79/80/42E/75	I+III	O

techniques required by activities performed in critical areas, as they may be related to a higher potential risk of transmission of infections. Individuals numbers 111, 112, 114 and 120 were intermittent carriers, and number 113 was a transient carrier of MRSA strains.

Each transient carrier yielded identical MRSA isolates (same phage type) suggesting the hands as a possible site of colonization and as a vehicle of spreading these organisms in both hospital and community environments.

MRSA isolated from hospital and control individuals were resistant to beta-lactam antibiotics or tetracycline, or both. Strains numbers 192 and 193 showed wide resistance patterns similar to those showed by MRSA strains associated with nosocomial outbreaks (2, 12, 23, 29).

Outbreaks caused by MRSA are difficult to control and often result in serious infections (12). These outbreaks are frequently centered in critical care units (28) of large hospitals affiliated with medical schools (11, 13). Infected and colonized patients act as reservoirs (28) and transient carriage on the hands of hospital personnel has been implicated in transmission from patient to patient (7, 21, 23). Our findings provide additional indirect evidence that the carriage of MRSA strains by hands of hospital individuals may represent a risk factor for nosocomial transmission of these organisms.

The prevalence of MRSA in the general population is a still unknown factor (27). The carriage of MRSA strains by hands of control individuals, showed in this study,

may suggest that, at least in our region, these organisms are not limited to hospital environment. Further studies to evaluate the epidemiological implications due to the carriage of MRSA strains by hands of people in the general population are necessary.

Phage typing indicated that fifteen distinct types of *S. aureus* (designated by letters A to O) were isolated in this study. Some of them were similar to those phage types reported as important cause of infections in different regions. Strains belonging to phage type 84 have been incriminated in outbreaks of MRSA infections in the United States (21). Phage type 85 has caused epidemic and endemic infections in Dublin hospitals (4, 5) and has also been reported as a cause of an outbreak in a dermatology unit at the University of Munich (19). Phage type 95 strains had epidemic significance in Denmark (24, 25) and have been isolated from patients with staphylococcal pneumonia in the United States (26). Our findings showed that phage type 85 was isolated from both hospital and control individuals, while types 84 and 95 were isolated only from hospital individuals.

The occurrence of intermittent (occasional) and transient hand carriage of MRSA, particularly among hospital personnel was shown. The high frequency of resistant *S. aureus* strains including MRSA could, at least in part, be attributed to the abusive and indiscriminate use of antimicrobials in Brazilian hospitals and even by the population in general, without having the isolation and/or the confirmation of the etiological agent.

The results show that strains of *S. aureus* resistant to β -lactams are frequently found among *S. aureus* colonizing the hands and emphasize the possible role of the hands as source or route for the dissemination of those microorganisms.

Acknowledgements

This work was supported by CAPES, CNPq, FINEP and CEPG - UFRJ. We thank the volunteers who participated in this study, Dr. Ana M. Uthida-Tanaka for providing laboratory facilities for phage typing and Marlei G. da Silva for technical assistance.

References

1. Barrett, F.F.; McGeehee, R.F.Jr. & Finland, M. - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Boston city hospital. Bacteriologic and epidemiologic observations. N. Engl. J. Med., 279:441-448, 1968.
2. Blair, J.E. & Williams, R.E.O. - Phage typing of staphylococci. Bull. Wld. Hlth. Org., 24:771-784, 1961.
3. Brachman, P.S. - Nosocomial infection control: an overview. Rev. Infect. Dis., 3:640-648, 1981.
4. Cafferkey, M.T.; Coleman, D.; McGrath, B.; Hone, R.; Pomeroy, H.; Ruddy, R. & Keane, C.T. - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dublin 1971-84. Lancet ii: 705-708, 1985.
5. Cafferkey, M.T.; Hone, R.; Falkiner, F.R.; Keane, C.T. & Pomeroy, H. - Gentamicin and methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Dublin hospitals: clinical and laboratory studies. J. Med. Microbiol., 16:117-127, 1983.
6. Cohen, M.L. - *Staphylococcus aureus*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. J. Pediatr., 108:796-799, 1986.
7. Crossley, K.; Landesman, B. & Zaske, D. - An outbreak of infections caused by strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin and aminoglycosides. II. Epidemiologic studies. J. Infect. Dis., 139:280-287, 1979.
8. Evans, J.B. & Kloos, W.E. - Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. Appl. Microbiol., 23:326-331, 1972.
9. Finegold, S.M. & Baron, E.J. - Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 7th ed. C.V. Mosby Company, St. Louis, p.355-365, 1986.
10. Gaschen, M. - Etude comparative de deux méthodes destinées au prélèvement de la flore microbienne des mains. Helv. Chir. Acta., 35:372-377, 1968.

11. Haley, R.W.; Hightower, A.W.; Khabbaz, R.F.; Thornsberry, C.; Martone, W.J.; Allen, J.R. & Hughes, J.M. - The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals. Possible role of the house staff-patient transfer circuit. *Ann. Intern. Med.*, 97:297-308, 1982.
12. Klimek, J.J.; Marsik, F.J.; Bartlett, R.C.; Weir, B.; Shea, P.; & Quintiliani, R. - Clinical, epidemiologic and bacteriologic observations of an outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a large community hospital. *Am. J. Med.*, 61:340-345, 1976.
13. Lally, R.T.; Ederer, M.N. & Woolfrey, B.F. - Evaluation of mannitol salt agar with oxacillin as a screening medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.*, 22:501-504, 1985.
14. Larson, E.L. - Persistent carriage of Gram-negative bacteria on hands. *Am. J. Infect. Control.*, 9:112-119, 1981.
15. Larson, E.L.; Strand, M.K. & Evans, C.A. - Analysis of three variables in sampling solutions used to assay bacteria of hands: type of solution, use of antiseptic neutralizers, and solution temperature. *J. Clin. Microbiol.*, 12:355-360, 1980.
16. Locksley, R.M.; Cohen, M.L.; Quinn, T.C.; Tompkins, L.S.; Coyle, M.B.; Kirihera, J.M. & Counts, G.W. - Multiply antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: introduction, transmission, and evolution of nosocomial infection. *Ann. Intern. Med.*, 97:317-324, 1982.
17. Maki, D.G. - Control of colonization and transmission of pathogenic bacteria in the hospital. *Ann. Intern. Med.*, 89:777-780, 1978.
18. Marples, R.R.; Richardson, J.F. & Saxe, M.J. - Bacteriological characters of strains of *Staphylococcus aureus* submitted to a reference laboratory related to methicillin resistance. *J. Hyg. (Camb.)*, 96:217-223, 1986.
19. Naidoo, J.; Noble, W.C.; Weissmann, A. & Dyke, K.G.H. - Gentamicin-resistant staphylococci: genetics of an outbreak in a dermatology department. *J. Hyg. (Camb.)*, 91:7-16, 1983.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards - Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa, 1984.
21. O'Toole, R.D.; Drew, W.L.; Dahlgren, B.J. & Beaty, H.N. - An outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Observations in hospital and nursing home. *J. Am. Med. Assoc.*, 213:257-263, 1970.
22. Pavillard, R.; Harvey, K.; Douglas, D.; Hewstone, A.; Andrew, J.; Collopy, B.; Asche, V.; Carson, P.; Davidson, A.; Gilbert, G.; Spicer, J. & Tosolini, F. - Epidemic of hospital-acquired infection due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in major Victorian hospitals. *Med. J. Aust.*, 1:451-454, 1982.
23. Peacock, J.E.Jr.; Marsik, F.J. & Wenzel, R.P. - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: introduction and spread within a hospital. *Ann. Intern. Med.*, 93:526-532, 1980.
24. Rosdahl, V.T. & Rosendal, K. - Correlation of penicillinase production with phage type and susceptibility to antibiotics and heavy metals in *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.*, 16:391-399, 1983.
25. Rosendal, K.; Jessen, O.; Faber, V. & Bentzon, M.W. - Frequency, phage types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from blood cultures in Denmark 1975 - 1981. *Scand. J. Infect. Dis.*, 41 (Suppl.):19-26, 1983.
26. Sanford, B.A.; Thomas, V.L.; Ramsay, M.A. & Jones, T.O. - Characterization of clinical strains of *Staphylococcus aureus* associated with pneumonia. *J. Clin. Microbiol.*, 24:131-136, 1986.
27. Schaeffler, S.; Jones, D.; Perry, W.; Baradet, T.; Mayr, E. & Rampersad, C. - Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in New York city hospitals: inter-hospital spread of resistant strains of type 88. *J. Clin. Microbiol.*, 20:536-538, 1984.
28. Thompson, R.L.; Cabezudo, I. & Wenzel, R.P. - Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.*, 309-317, 1982.

29. Thomsberry, C.; Gavan, T.L. & Gerlach, E.H. - New developments in antimicrobial agent susceptibility testing. Cumitech 6. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1977.
30. Varaldo, P.E.; Cipriani, P.; Focá, A.; Geraci, C.; Giordano, A.; Madeddu, M.A.; Orsi, A.; Pompei, R.; Prenna, M.; Scazzocchio, F. & Stassi, G. - Identification, clinical distribution, and susceptibility to methicillin and 18 additional antibiotics of clinical *Staphylococcus* isolates: nationwide investigation in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, 19:838-843, 1984.
31. Vickery, A.M.; Beard-Pegler, M.A. & Stubbs, E. - Phage-typing patterns and lysogenicity of methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* from Sydney, Australia, 1965-85. *J. Med. Microbiol.*, 22:209-216, 1986.

LEITE ACIDÓFILO: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* DE FEZES DE CRIANÇAS ALIMENTADAS AO SEIO E DE BEZERROS

Nomina Sueley Santos Sabioni

Recebido para publicação em 03/05/88

Rua Artur Vitorino Coelho, 91
35400 Ouro Preto, MG

Adão José Resende Pinheiro
& Magdala Alencar Teixeira

Deptº de Tecnologia de Alimentos - UFV
36570 Viçosa, MG

Resumo

Estirpe de *L. acidophilus* foram isoladas de matéria fecal de crianças com três dias de idade, alimentadas exclusivamente ao seio, e de bezerros com dois dias de vida. Caracterizaram-se os isolados por critérios morfológicos e fisiológicos. Do total de isolados, 2,1% (cinco de origem humana e três de origem bovina) foram caracterizados como *L. acidophilus* e submetidos a testes de tolerância a sais biliares, e a avaliação de suas capacidades de produzir ácido e ter atividade antagonista a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. É possível que apenas uma das estirpes isoladas de fezes humana, a UFV H2b20, em meio com teor de oxigênio reduzido, possa ser utilizada como adjunto dietético. Esta estirpe foi resistente a 1,0% de sais biliares, produziu 1,05% de ácido lático em 14 horas e inibiu bactérias patogênicas e saprófitas em alimentos.

Summary

*Acidophilus Milk: Isolation and characterization of *Lactobacillus acidophilus* from breast-fed children and from young calves feces*

Bacteria were isolated from faecal excreta of three days old children and two days old calves (fecal excretion). They were characterized by morphological and biochemical criteria. Five strains from human and three from bovine origins were characterized as *L. acidophilus*. Their resistance to bile salts, capacity of lactic acid production and activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria were measured. Only *L. acidophilus* UFV H2b20 had the necessary characteristics to be used as a dietetic adjunct, as it was resistant to 1% bile salts, produced 1,05% lactic acid in fourteen hours and was able to inhibit patogenic and saprophytic Gram-positive and Gram-negative bacteria.

Introdução

A primeira tentativa visando o uso de microrganismos como adjunto dietético provavelmente tenha sido feita por Metchnikoff (3, 4). O interesse pela microbiota intestinal tem sido voltado, principalmente para o *Lactobacillus acidophilus*,

isolado de fezes de crianças alimentadas ao seio. Esta bactéria é considerada como habitante natural do intestino sendo capaz de se estabelecer e beneficiar terapêutica e nutricionalmente o hospedeiro (9, 13). Embora sejam muitas as vantagens do uso de *L. acidophilus*, há limitações quanto a sua utilização na dieta humana, devido, principalmente, ao sabor pouco apreciado de seus produtos de fermentação, da dificuldade de manutenção destes microrganismos em laboratório e na obtenção de estirpes que possam sobreviver às condições adversas do trato gastrointestinal e de se implantarem no intestino.

No presente trabalho procurou-se isolrar o *L. acidophilus* de fezes de crianças, alimentadas ao seio e de bezerros, e selecionar as estirpes destes microrganismos com características que permitam o seu uso como adjunto.

Material e Métodos

Fonte de microrganismos - O material fecal usado para o isolamento do *L. acidophilus* foi obtido no berçário do Hospital São Sebastião da cidade de Viçosa-MG, e no estábulo do Departamento de Zootecnia da UFV. Foram coletadas fezes de crianças, com três dias de idade, alimentadas exclusivamente ao seio e de bezerros alimentados com colostro, com dois dias de idade.

Isolamento dos microrganismos - As amostras fecais em diluições decimais foram preparadas em água peptonada (1%) esterilizada e transferidas para caldo seletivo para isolamento de lactobacilos, segundo Rogosa & Cols. (11). Após 24 horas de incubação, a 37°C, os tubos com crescimento, evidenciado pelo aumento da turbidez, foram plaqueados no meio utilizado anteriormente, acrescido de 1,5% de ágar. Placas, em duplicatas, foram semeadas a partir de cada diluição e incubadas aerobicamente e em meio com teor de oxigênio reduzido. As colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo leite desnatado reconstituído com 10% extrato seco desengordurado (ESD), esterilizado a 121°C, durante 15 minutos e a seguir incubados por 24 horas, a 37°C. Os tubos que apresentaram crescimento foram estocados sob refrigeração (5°C) para posterior caracterização, sendo as culturas transferidas para novo meio em intervalos de 10 dias.

Classificação dos isolados - Somente aqueles isolados que apresentaram bastonetes Gram-positivos e catalase negativos foram estocados para posterior identificação. A produção de catalase foi observada pela formação de bolhas ao redor das colônias em ágar Man, Rogosa & Sharpe (MRS-Merck) quando acrescidas de 1ml de solução de peróxido de hidrogênio a 3% (V/V), como citado por Norris & Ribbons (8).

A redução do nitrato foi determinada em caldo nitrato (Difco), contendo 0,1% de nitrato de potássio.

O meio desenvolvido por Niven & Cols. (7) foi utilizado para determinação da produção de amônia, a partir de arginina sendo a formação de amônia evidenciada após a adição de reagente de Nessler.

A atividade dos lactobacilos no leite foi observada em tubos contendo leite tornassolato (Difco) esterilizado, após 48 horas de incubação a 37°C.

As culturas foram testadas quanto ao crescimento a 15, 22, 45 e 48°C em leite desnatado reconstituído (10% ESD) e produção de gás em caldo MRS (Merck), contendo 5% de glucose, usando os tubos de fermentação de Durham (1).

O caldo MRS desprovido de glucose e extrato de carne constituiu o meio básico para testar a capacidade fermentativa conforme recomendação de Man & Cols. (6). Foram utilizados para os testes a amigdalina, arabinose, cellobiose, frutose, galactose, glucose, gluconato, lactose, maltose, manita, manose, malezitose, melibiose, rafinose, ramnose, ribose, salicina, sorbitol, sacarose e xilose.

Tolerância a sais biliares - A tolerância dos isolados quanto a sais biliares foi testada, conforme procedimentos adotados por Klaenhammer & Kleenan (5); foram determinados os números de unidades formadoras de colônias para cada nível de sais biliares.

Produção de ácido - Inoculou-se 1% da cultura, de cada isolado, em leite desnatado reconstituído (10% ESD) esterilizado. A acidez titulável, média de duas repetições e expressa em ácido láctico, foi determinada a cada hora até atingir o máximo de produção.

Atividade antagonista - A atividade antagonista dos isolados foi verificada com base nas sugestões de Shahani & Cols. (12). A capacidade inibidora dos isolados de *L. acidophilus* sobre 13 microrganismos diferentes foi determinada pelo método de difusão em discos, a intervalos de 8 horas, por um período de 40 horas, a 37°C.

Resultados e Discussão

Como resultado do plaqueamento das amostras fecais obteve-se microrganismos que formavam colônias do tipo rugosa e do tipo lisa, semelhantes as anteriormente designadas por Rettger & Norton, citados por Smith (13), como do tipo X e tipo Y, respectivamente.

Selecionaram-se 119 isolados representativos da família Lactobacillaceae, com base nos testes bioquímicos, do total de 375 culturas estoques isoladas de fezes humanas e de bezerros. Estes isolados foram agrupados com base na capacidade dos heterofermentativos produzirem dióxido de carbono a partir de glucose, a amônia a partir de arginina. Foram considerados homofermentativos 76 isolados dos quais 29 foram selecionados com base em suas temperaturas de crescimento, descritas pelo "Berger's Manual of Determinative Bacteriology" (10); incapazes de crescer a 15°C e capazes de crescer a 45°C (Tabela 1). Os isolados selecionados foram capazes de acidificar e coagular o leite tornassolado em até 48 horas de incubação a 37°C.

Verificando a Tabela 2, oito isolados, cinco de origem humana e três de bovinos, apresentaram características próprias do *Lactobacillus acidophilus*, de acordo com o "Berger's Manual of Determinative Bacteriology" (10). Os isolados de bezerros fermentaram a ribose; entretanto, as características apresentadas por estes isolados se aproximam mais do *L. acidophilus* que de outros lactobacilos homofermentativos. Em relação aos testes fermentativos, a frutose, galactose, glucose, lactose, manose e sacarose foram sempre utilizados enquanto o gluconato, melezitose, melibiose, rafinose e ramnose não foram fermentados. Os isolados de origem bovina que não fermentaram a salicina, não foram excluídos; Morrison (2) cita que esta espécie pode fermentar ou não a salicina, variação esta que depende tanto do meio básico usado como das condições experimentais.

Visando a sua utilização como adjunto dietético, os isolados caracterizados como *L. acidophilus* foram testados quanto a tolerância a sais biliares, produção de ácido láctico e atividades antagonista a diversos microrganismos.

A Tabela 3 mostra o comportamento dos *L. acidophilus* em ágar MRS, contendo diversos níveis de sais biliares. Dos isolados de origem bovina, B4a4 e B3a13, resistiram a 1% de sais biliares, comportando-se de maneira similar ao controle em todas as concentrações testadas. Um dos isolados de bezerro, B3a3,

Tabela 1 - Crescimento de isolados de Lactobacilos homofermentativos, a diversas temperaturas.

Símbolos: H = Origem humana; B = Origem bovina; 1,2,3,4 = Indivíduos; a = Condição de incubação aeróbica; b = Baixa tensão de oxigênio; 1 a 31 = Número do isolado; + = Crescimento e - = Ausência de crescimento.

Lactobacilos	Temperatura (°C)			
	15	22	45	48
H1b2	-	+	+	+
H1b3	-	+	+	+
H1b6	-	+	+	+
H1b11	-	+	+	+
H1b14	-	+	+	+
H1b24	-	+	+	+
H1b31	-	+	+	+
H2a2	-	+	+	+
H2a5	-	+	+	+
H2a6	-	+	+	+
H2a7	-	+	+	+
H2a8	-	+	+	+
H2a13	-	+	+	+
H2a14	-	+	+	+
H2a16	-	+	+	+
H2a20	-	+	+	+
H2b1	-	+	+	+
H2b4	-	-	+	+
H2b14	-	-	+	-
H2b20	-	+	+	+
H2b21	-	-	-	-
B3a1	-	+	-	-
B3a2	-	+	+	-
B3a3	-	+	+	-
B3a5	+	+	+	-
B3a7	-	+	+	+
B3a10	-	+	+	-
B3a13	+	+	+	-
B3a18	-	+	+	-
B3a19	-	+	+	+
B4a4	-	+	-	-

Tabela 2 - Principais testes aplicados aos *Lactobacillus acidophilus* isolados de matéria fecal.

Símbolos: Testes bioquímicos: A = Ácido, PA = Pouco ácido.

Testes	<i>L. acidophilus</i>							
	Origem Humana				Origem Bovina			
	H2b4	H4b14	H2b20	H2b21	H1b11	B4a4	B3a3	B3a13
Crescimento a 15°C	-	-	-	-	-	-	-	-
Crescimento a 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+
Gás de glucose	-	-	-	-	-	-	-	-
Hidrólise de arginina	-	-	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	A	A	A
Arabinose	-	-	-	-	-	A	-	A
Cellobiose	A	A	A	A	PA	A	-	A
Frutose	A	A	A	A	A	A	A	A
Galactose	A	A	A	A	A	A	A	A
Glucose	A	A	A	A	A	A	A	A
Glucuronato	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	A	PA	A	A	A	A	A	A
Maltose	A	-	PA	PA	A	A	A	A
Manitol	PA	PA	-	A	-	-	A	-
Manose	A	A	PA	A	A	A	A	A
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinose	-	-	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	-	-	-	PA	A	A	A
Salicina	-	-	-	-	-	A	A	A
Sorbitol	A	-	-	-	-	-	A	-
Sacarose	A	A	PA	A	A	PA	A	A
Xilose	-	-	-	-	-	-	-	A

Tabela 3 - Crescimento dos isolados de *L. acidophilus* em ágar MRS, em UFC/ml, contendo diferentes níveis de sais biliares. Símbolos: 1/ UFC/ml = Unidades formadoras de colônias por mililitro; 2 NC = Nenhum crescimento na menor diluição (10⁻⁵).

Sais Biliares %	Origem Humana						Origem Bovina		
	H2b4	H2b14	H2b20	H2b21	H1b11	B4a4	B3a3	B3a13	
0	7,9x10 ⁸	2,6x10 ⁹	1,1x10 ⁹	3,0x10 ⁸	5,7x10 ⁸	UF/ml ^{1/}	6,9x10 ⁸	7,3x10 ⁸	1,7x10 ⁸
0,2	NC ^{2/}	1,7x10 ⁹	4,5x10 ⁸	NC	NC		6,1x10 ⁸	1,1x10 ⁸	1,5x10 ⁸
0,3	NC	2,0x10 ⁹	3,9x10 ⁸	NC	NC		7,1x10 ⁸	9,6x10 ⁷	1,3x10 ⁸
0,4	NC	1,7x10 ⁹	3,5x10 ⁸	NC	NC		6,4x10 ⁸	8,0x10 ⁷	1,5x10 ⁸
0,5	NC	1,8x10 ⁹	3,1x10 ⁸	NC	NC		6,8x10 ⁸	1,5x10 ⁷	1,4x10 ⁸
0,6	NC	1,6x10 ⁹	6,0x10 ⁷	NC	NC		6,5x10 ⁸	7,9x10 ⁷	1,6x10 ⁸
0,7	NC	1,6x10 ⁹	4,0x10 ⁸	NC	NC		6,3x10 ⁸	8,9x10 ⁷	1,4x10 ⁸
0,8	NC	1,4x10 ⁹	2,5x10 ⁸	NC	NC		5,9x10 ⁸	9,6x10 ⁷	1,3x10 ⁸
0,9	NC	1,8x10 ⁹	2,1x10 ⁸	NC	NC		6,5x10 ⁸	NC	1,2x10 ⁸
1,0	NC	9,8x10 ⁸	6,8x10 ⁷	NC	NC		6,4x10 ⁸	NC	1,6x10 ⁸

menos resistente, foi incapaz de formar colônias em meio contendo mais de 0,8% de sais biliares. Dos isolados de origem humana, H2b4, H2b21 e H1b11, foram incapazes de formar colônias no meio contendo 0,2%; enquanto o H2b14 e H2b20, resistiram à concentrações mais elevadas de sais biliares. Estes isolados capazes de crescer em concentrações elevadas de sais biliares, podem ter capacidade de habitar o trato intestinal do homem.

Em virtude da capacidade fermentativa das bactérias láticas, numerosos metabólitos são produzidos, principalmente os de natureza ácida. A atividade antimicrobiana do *L. acidophilus* é atribuída, em grande parte, à produção de ácido láctico (14). De acordo com as Figuras 1, a acidez máxima produzida pelas culturas

variou de 0,59 a 1,13%. Os menores valores foram obtidos dos isolados provenientes do material fecal bovino, em períodos de incubação mais longos. A produção de grandes quantidades de ácido lático é importante, pois o efeito bacteriostático ou bacteriocida deste ácido depende da sua concentração. As culturas que produzem teores mais elevados de ácido lático, possivelmente tornam os produtos lácteos menos palatáveis e necessitam serem estocadas sob refrigeração para evitar perda de viabilidade.

Verifica-se que apenas dois isolados do *L. acidophilus* de origem humana, exhibiram atividade inibidora de moderada a forte sobre os microrganismos testados (Tabela 4), em função do tempo de incubação. Os resultados da ação antagonista dos isolados mostraram que os agentes inibidores apresentam amplo espectro de atividade, atuando contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como sobre alguns patógenos, sendo ainda necessário determinar o mecanismo desta ação antagonista.

Conclusões

Dentre os 375 isolados de fezes humanas e bovinas, 76 (20,2%), foram classificadas como lactobacilos homofermentativos, oito dos quais foram identificados como *Lactobacillus acidophilus*, sendo três de origem bovina e cinco de origem humana.

Os resultados demonstraram que duas estirpes de origem humana H2b14 e H2b20 e três de origem bovina, B4a4, B3a3 e B3a13, tendo em vista a sua capacidade de crescimento em presença de sais biliares, podem ter capacidade de sobreviver e de se implantar no trato intestinal humano e bovino.

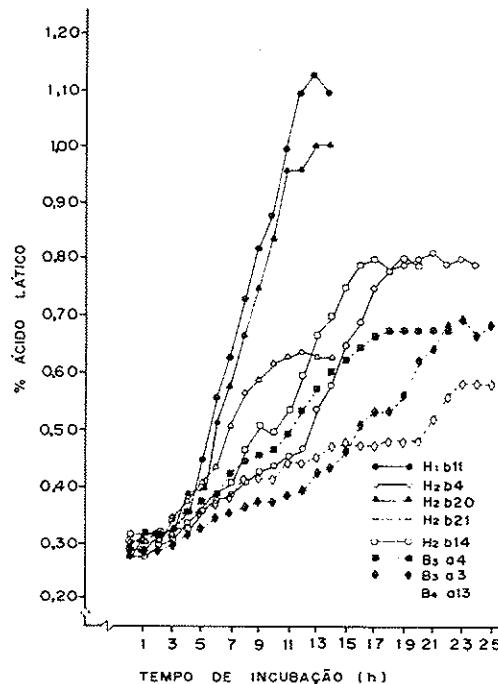
Observou-se ainda, que duas estirpes de *L. acidophilus* de origem humana, apresentaram grande capacidade de produção de ácido, indicando sua possível utilização no controle de distúrbios gastrointestinais.

Tabela 4 - Atividade antagonista dos isolados de *L. acidophilus* incubados a 37°C por 40 horas, sobre diversos microrganismos.

Símbolos: 4 = Inibição muito forte da cultura teste; 3 = Inibição forte; 2 = Inibição moderada; 1 = Inibição fraca e 0 = Nenhuma inibição.

Organismos testes	Origem Humana											
	H2b11					H2b20						
	0	8	16	24	32	40	0	8	16	24	32	40
<i>Bacillus cereus</i>	0	0	2	4	4	4	0	3	3	3	3	3
<i>Escherichia coli</i> K12	0	3	3	3	3	3	0	3	4	4	4	4
<i>Escherichia coli</i>	0	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3
<i>Klebsiella</i> sp	0	0	0	0	2	3	0	0	2	2	3	3
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	0	3	3	3	0	0	3	3	4	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0	3	3	3	3	3	0	2	3	3	3	3
<i>Proteus</i> sp	0	0	0	3	3	3	0	0	0	2	3	3
<i>Salmonella agona</i>	0	3	3	3	3	3	0	0	0	3	3	3
<i>Salmonella</i> sp	0	0	0	0	0	3	0	0	0	2	3	3
<i>Salmonella typhimurium</i>	0	3	3	3	3	3	0	0	3	3	3	3
<i>Serratia marcescens</i>	0	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	4
<i>Shigella flexneri</i>	0	3	3	3	3	3	0	0	2	3	3	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	3	3	3	3	3	0	3	3	3	3	3

Figura 1 - Produção de ácido lático pelos isolados de *L. acidophilus* de origem fecal humana (H) e de origem fecal bovina (B) em função do tempo de incubação.



Os resultados apresentados indicaram que a estirpe de origem humana, H2b20, a partir de agora denominado *L. acidophilus* UFV H2b20, como referência ao local de isolamento, capaz de inibir os microrganismos testados, possa ser utilizada como adjunto dietético.

Referências Bibliográficas

1. Collins, E.B. & Hartlein, K. - Influences of Temperature on lactobacilli of nonfermented acidophilus milks. *J. Dairy Sci.*, 65(6):883-886, 1982.
2. Harrison, A.P. & Hansen, A. - Lactobacilli from turkeys. *J. Bacteriol.*, 60(6):543-555, 1950.
3. Hawley, H.B.; Shepherd, P.A. & Wheater, D.M. - Factors affecting the implantation of lactobacilli in the intestine. *J. Appl. Bacteriol.*, 22(3):360-367, 1959.
4. Johansson, K.E. & Sarles, W.B. - Some consideration of the biological importance of intestinal microorganisms. *Bacteriol. Rev.*, 13(1):25-45, 1949.
5. Klaenhammer, T.R. & Kleeman, E.G. - Growth characteristics, bile sensitivity and freeze damage in colonial variants of *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41:1461-1467, 1981.
6. Man, J.C. de; Rogosa, M. & Sharpe, M.E. - A medium for the cultivation of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.*, 23(1):130-135, 1960.
7. Niven, C.F.; Smiley, K.L. & Sherman, J.M. - The hydrolysis of arginine by streptococci. *J. Bacteriol.*, 43(6):651-660, 1942.
8. Norris, J.R. & Ribbons, D.W. - Methods in microbiology. V. 6A. Academic Press, London and N.Y., 1971.
9. Rasic, J. & Kurman, J.A. - Yoghurt. V. 1. Scientific grounds, technology, manufacture and preparation. Switzerland. 1978. 467p.
10. Rogosa, M. - Gram-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria. In: Buchanan, R.E. ed. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. The Willians and Wilkins Co., Baltimore, 1974. p.576-593.
11. Rogosa, M.; Mitchell, J.A. & Wiseman, R.F. - A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J. Bacteriol.*, 62:132-133, 1951.
12. Shahani, K.M.; Vakil, J.R. & Kilaram A. - Natural antibiotics activity of *Lactobacillus acidophilus* and *bulgaricus*. I. Cultural conditions for the production of antibiosis. *Cultured Diary Prod. J.*, 11(4):14-17, 1976.
13. Smith, R.P. - The implantation or enrichment of *Bacillus acidophilus* and other organisms in the intestine. *British Medicine J.*, 11:948-950, 1924.
14. Stamer, J.R. - The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food Technol.*, 33(1):60-65, 1979.
15. Stamer, J.R. The lactic acid bacteria: microbes of diversity. *Food Technol.*, 33(1):60-65, 1979.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE *LEPTOSPIRA BIFLEXA* NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE TRIAGEM DA LEPTOSPIROSE ANIMAL

Margareth Elide Genovez

Recebido para publicação em 05/05/88

Medica Veterinária

Pesquisador Científico do Instituto Biológico de São Paulo

& Paulo Hideki Yasuda

Professor Doutor

Instituto de Ciências Biomédicas

Universidade de São Paulo

Resumo

Avaliou-se a eficiência de estirpes de *Leptospira biflexa*, como抗ígenos na técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), para diagnóstico de triagem da leptospirose animal. Foi selecionado um total de 559 soros das espécies bovina, suína, bubalina, equina e canina; de animais provenientes na sua maioria de rebanhos problemas e/ou de casos suspeitos da doença. Esses soros foram inicialmente submetidos a SAM com 20 sorotipos de *Leptospira interrogans* e posteriormente com as estirpes Buenos Aires, Patoc-1, Rufino e São Paulo. Foram determinados os índices de sensibilidade, especificidade, concordância, valores preditivos do positivo e do negativo e resultados falsos. As estirpes aquicolas estudadas não se mostraram eficientes para serem recomendadas como antígeno único ou em conjunto, para diagnóstico de triagem da leptospirose animal.

Summary

Efficiency evaluation of Leptospira biflexa strains on screening serological diagnosis of the animal leptospirosis

Four *Leptospira biflexa* strains were evaluated as screening antigens on MAT, for animal leptospirosis diagnosis. It was chosen a total of 559 sera of bovine, swine, bubaline, equine and canine species from problem cattle and/or sickness suspect cases. First, these sera were submitted to MAT with 20 serovars of *Leptospira interrogans* and afterwards to Buenos Aires, Patoc, Rufino and São Paulo water strains. Sensibility, specificity, agreement, predictive values and false results were determined. The water strains, individually or all together were not recommended as screening test.

Introdução

A reação de soroaglutinação microscópica se constitui ainda na prova de referência pela Organização Mundial Saúde (14), para diagnóstico da leptospirose. No entanto, sua forma laboriosa de trabalho exige manutenção de grandes estoques de culturas matrizes, o que gera intensa mão de obra técnica e consome elevado volume de meio de cultura e drogas, além de submeter o operador ao risco de contaminação. Por essas razões, fica restrita a rotina de poucos laboratórios, geralmente situados nos centros mais desenvolvidos.

Diante dessas limitações e com o conhecimento de que certas estirpes agrícolas

são aglutinadas por soros de indivíduos infectados ou convalescentes de leptospirose (21), os pesquisadores propuseram provas de caráter gênero-específicas utilizando抗ígenos da espécie *L. biflexa* (1-5, 7-10, 12, 13, 15-17, 19, 20). Dentre as estirpes agrícolas mais estudadas estão Patoc-1, São Paulo, Rufino e Buenos Aires.

Em medicina humana, essas provas que utilizam a estirpe Patoc-1 são bastante sensíveis, fornecendo resultados precoces, sendo empregadas com sucesso. Entretanto, em medicina veterinária, o emprego de diversas estirpes saprófitas nas diferentes técnicas sorológicas, até o presente momento, oferecem resultados conflitantes e na sua maioria insatisfatórios (3, 4, 10, 12, 17).

O presente trabalho propõe a avaliação da eficiência de estirpes agrícolas de *Leptospira biflexa*, como antígeno de triagem na técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), padronizada segundo as recomendações da OMS, para diagnóstico da leptospirose animal.

Material e Métodos

A SAM foi rigorosamente padronizada pelas normas da OMS (14). Procurou-se selecionar soros de rebanhos problemas, previamente conhecidos, que contavam ou com histórico de abortamento ou com controle sorológico anterior, mostrando a ocorrência de animais reagentes. No caso da espécie canina, como o número de soros provenientes de animais doentes de leptospirose foi insuficiente, introduziram-se soros de animais errantes.

Cinco soros; dois da espécie bovina, dois da suína e um da canina, foram incluídos como controle por serem provenientes de animais sabidamente doentes com isolamento e tipificação de sorotipos. Para as espécies canina e bubalina não foi possível a inclusão de soros controle.

Foram examinados 559 soros assim distribuídos: 179 bovinos, 159 suínos, 80 bubalinos, 79 equinos e 62 caninos.

Com a finalidade de se evitar amostragem tendenciosa em relação ao sorotipo reagente, foram selecionadas propriedades de regiões diferentes.

O experimento foi dividido em duas fases. Na primeira, todos os soros foram testados com 20 sorotipos de *Leptospira interrogans*: andamana, australis, autumnalis, ballum, bataviae, brasiliensis, butembo, canicola, castellonis, copenhageni, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae, javanica, panama, pomona, pyrogenes, shermani, tarassovi, whitcombi, wolffi.

Na segunda, esses soros foram submetidos às estirpes Buenos Aires, Patoc-1, Rufino e São Paulo.

Para determinação da eficiência relativa das estirpes saprófitas frente aos soros de cada espécie animal, foram calculados os índices relativos de sensibilidade (S_r), especificidade (E_r), valores preditivos positivos e negativos (V_p+ , V_p-), concordância (C) e falsos positivos e negativos (F_+ , F_-) (11). Com a finalidade de verificar se havia concordância entre as respostas sorológicas obtidas com estirpes patogênicas e com estirpes agrícolas de *Leptospira biflexa* entre si, usou-se o teste de Cochran (18), para $K > 2$ amostras relacionadas. Quando este teste mostrou haver discordância significante entre os resultados, isto é, pelo menos uma das estirpes de leptospires testadas individualmente discordava das outras ($K \geq 5$), complementou-se a análise estatística aplicando-se o teste de McNemar (18), para $K=2$ amostras relacionadas, com o objetivo de se identificar qual era a estirpe discordante da prova de referência e se essa discordância era significativa.

Posteriormente, com a finalidade de se investigar se havia concordância entre os resultados da prova de referência e o conjunto de respostas obtidas com as estirpes aquáticas, empregou-se novamente o teste de MacNemar para $K=2$ amostras relacionadas.

Em todos os casos, usou-se o valor de $p \leq 0,05$ para nível de rejeição da hipótese de nulidade.

Resultados

Dos 559 soros animais examinados pela SAM com 20 sorotipos de *Leptospira* sp., 325 (58,1%) foram reagentes; sendo 127 (71,0%) bovinos, 86 (54,1%) suínos, 50 (62,5%) bubalinos, 32 (40,5%) equinos e 30 (48,4%) caninos. Os demais soros, 234 (41,9%) não foram reagentes.

Na espécie bovina o sorotipo mais frequente foi pomona (80,3%), seguido pelo wolffi (14,9%), panama (2,4%), icterohaemorrhagiae (0,8%), copenhageni (0,8%) e tarassovi (0,8%). Na suína, todos os soros reagentes o foram para o sorotipo pomona. Na espécie bubalina, o sorotipo mais observado foi wolffi (60,0%), seguido pelo tarassovi (12,0%), panama (10,0%), grippotyphosa, bataviae, canicola (4,0% cada) e australis, javanica e pyrogenes (2,0% cada). Na equina, o sorotipo mais encontrado foi copenhageni (78,1%), a seguir pomona (9,4%), icterohaemorrhagiae e javanica (6,2% cada). Na espécie canina, o mais frequente foi copenhageni (56,7%), canicola (13,3%), grippotyphosa (10,0%), pyrogenes (6,7%) e castellonis, butembo, javanica e shermani (3,3% cada).

Os soros controle confirmaram sua positividade frente os sorotipos de *Leptospira* sp., sendo os dois de bovino reagentes para o sorotipo pomona, com título de 1:400 e 1:800, respectivamente; os dois de suíno ambos reagentes para o sorotipo pomona, com título de 1:400 e o soro de cão positivo para o sorotipo copenhageni, com título de 1:400.

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos com estirpes aquícolas frente aos soros reagentes e não reagentes para *Leptospira interrogans*.

O soro controle da espécie canina foi reagente para as estirpes Patoc 1 e São Paulo com título de 1:100; mas apenas um dos soros controle da espécie bovina foi reagente, estirpe Rufino com título de 1:100. Nenhum dos soros controle da espécie suína aglutinaram frente as estirpes aquícolas.

Um fenômeno frequentemente observado durante a leitura foi a auto-aglutinação após o período de incubação, evidenciada através de verificação dos tubos controle dos antígenos.

Durante a leitura da prova com emprego de estirpes saprófitas, observou-se diminuição da proporção de leptospires livres, sendo consideradas negativas por não estarem de acordo com o critério de 50% preconizado pela OMS.

Tabela 1 - Resultados obtidos com soros animais, reagentes para *L. interrogans* na soroaglutinação microscópica, confrontados com quatro estirpes de *L. biflexa*.

Símbolos: R: reagente e NR: não reagente.

Espécie	Condição	Buenos Aires		Patoc 1		Rufino		São Paulo	
		R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
Bovina (127)		25	102	34	93	65	62	12	115
Suína (86)		4	82	13	73	20	66	5	81
Bubalina (50)		5	45	8	42	4	46	0	50
Equina (32)		2	30	5	27	4	28	4	28
Canina (30)		3	27	7	23	0	30	4	26

Tabela 2 - Resultados obtidos com soros animais, não reagentes para *L. interrogans* na soroaglutinação microscópica, confrontados com quatro estirpes de *L. biflexa*.

Símbolos: R: reagente e NR: não reagente.

Espécie	Condição	Buenos Aires		Patoc 1		Rufino		São Paulo	
		R	NR	R	NR	R	NR	R	NR
Bovina (52)		5	47	2	50	2	50	2	50
Suína (73)		0	73	0	73	4	69	1	72
Bubalina (30)		1	29	1	29	2	28	0	30
Equina (47)		0	47	1	46	0	47	0	47
Canina (32)		0	32	2	30	1	31	0	32

As Tabelas 1 e 2 apresentam os resultados obtidos com estirpes aquícolas frente aos soros reagentes e não reagentes para *Leptospira interrogans*.

O soro controle da espécie canina foi reagente para as estirpes Patoc 1 e São Paulo com título de 1:100; mas apenas um dos soros controle da espécie bovina foi reagente, estirpe Rufino com título de 1:100. Nenhum dos soros controle da espécie suína aglutinaram frente as estirpes aquícolas.

Um fenômeno frequentemente observado durante a leitura foi a auto-aglutinação após o período de incubação, evidenciada através de verificação dos tubos controle dos antígenos.

Durante a leitura da prova com emprego de estirpes saprófitas, observou-se diminuição da proporção de leptospires livres, sendo consideradas negativas por não estarem de acordo com o critério de 50% preconizado pela OMS.

Tabela 3 - Resultados relativos de sensibilidade (Sr), especificidade (Er), concordância (C), valores preditivos (Vp+Vp-), falso positivo (F+) e falso negativo (F-) da reação de soroaglutinação microscópica dos soros animais frente a quatro estirpes de *L. biflexa*, comparados a prova de referência.
 Símbolos: * prova de referência: soroaglutinação microscópica com 20 sorotipos de *Leptospira* sp.

Estirpe	Buenos Aires					Patos I					Rufino					São Paulo					
	Espécie	BOV.	SUÍ.	BUB.	EQU.	CAN.	BOV.	SUÍ.	BUB.	EQU.	CAN.	BOV.	SUÍ.	BUB.	EQU.	CAN.	BOV.	SUÍ.	BUB.	EQU.	CAN.
Sr		19,7	4,6	10,0	6,2	10,0	26,8	15,1	16,0	15,6	23,3	51,2	23,2	8,0	12,5	0	9,4	5,8	0	12,5	13,3
Er		90,4	100	96,7	100	100	96,2	100	96,7	97,9	93,8	96,2	94,5	93,3	100	96,9	96,2	98,6	100	100	100
C		40,2	48,4	42,5	62,0	56,4	46,9	54,1	46,2	64,6	59,7	64,2	56,0	40,0	64,6	50,0	34,6	48,4	37,5	64,6	58,1
Vp+		83,3	100	83,3	100	100	94,4	100	88,9	83,3	77,8	97,0	83,3	66,7	100	0	85,7	83,3	0	100	100
Vp-		31,5	47,1	39,2	61,0	54,2	35,0	50,0	40,8	63,0	56,6	44,6	51,1	37,8	62,7	50,8	76,9	47,0	37,5	62,7	55,2
F+		9,6	0	3,3	0	0	3,8	0	3,3	2,1	6,2	4,0	5,5	6,7	0	3,1	4,0	1,4	0	0	0
F-		80,3	95,3	90,0	93,8	90,0	73,2	84,9	84,0	83,4	76,7	48,8	76,7	92,0	87,5	100	50,6	94,2	100	87,5	86,7

Não houve correlação entre os títulos obtidos com sorotipos patogênicos e com saprófitas. Os títulos observados com as estirpes aquáticas foram baixos, raramente ultrapassando 1:100.

Os índices relativos de sensibilidade, especificidade, concordância, valores preditivos e falsos resultados calculados para cada espécie animal frente a cada uma das estirpes aquáticas são apresentados na Tabela 3.

A análise conjunta dos resultados obtidos frente as estirpes saprófitas mostrou ligeiro aumento na sensibilidade do teste, como se observa nas Tabelas 4 e 5.

Os cálculos estatísticos do teste de Cochran mostraram haver discordância significativa entre as respostas sorológicas obtidas na prova de referência (SAM) e na de triagem entre si, em cada uma das espécies estudadas. Os valores da estatística Q foram significantes, sendo 227,6; 218,6; 140,6; 85,8 e 18,4 respectivamente para as espécies bovina, suína, bubalina, equina e canina; onde o Q crítico para o nível de significância adotado era igual a 9,49. Completamente a análise com o teste de McNemar, observou-se discordância significante entre os resultados obtidos com cada uma das estirpes de *Leptospira biflexa* analisados em relação a SAM, quando comparados dois a dois, em cada espécie estudada. Os valores da estatística χ^2 foram significantes, para χ^2 crítico igual a 3,84, como mostra a Tabela 6.

Quando se analisou o conjunto de resultados, os valores da estatística χ^2 foram também significantivamente discordantes, como mostra a Tabela 6, para o mesmo χ^2 crítico.

Tabela 4 - Análise conjunta dos resultados das reações de soroaglutinação microscópica observados com soros animais reagentes e não reagentes frente as quatro estirpes de *L. biflexa*.

Símbolos: R: reagentes e NR: não reagentes.

Espécie	Bovina			Suína			Bubalina			Equina			Canina		
	R	NR	T	R	NR	T	R	NR	T	R	NR	T	R	NR	T
SAM c/ <i>Leptospira</i> sp															
R	85	42	127	33	53	86	12	38	50	11	21	32	11	19	30
NR	11	41	52	4	69	73	3	27	30	1	46	47	3	29	32
T	96	83	179	37	122	159	15	65	80	12	67	79	14	48	62

Discussão

O processo de diagnóstico requer dois passos essenciais. No primeiro, há o estabelecimento de várias hipóteses diagnósticas, seguido da tentativa de redução do número dessas hipóteses, através de progressivas decisões de exclusão (11). Esse processo necessita de testes muito sensíveis que quando fornecem resultados normais, permitem excluir, com alto grau de confiança, a doença a que foram destinados identificar. O segundo passo, objetiva provar uma forte suspeita clínica. Nesse processo aplicam-se testes altamente específicos que quando anormais, confirmam a presença da doença suspeita.

A aplicação de testes de triagem se enquadra no primeiro passo pois tem por finalidade descobrir entre os indivíduos aparentemente saudáveis, aqueles que estejam infectados ou doentes, e deste modo submetê-los ao tratamento adequado; se for doença transmissível permite adotar precocemente medidas de controle e prevenção (22).

Um teste de triagem aceitável deve fornecer em elevada porcentagem, resultados alterados em indivíduos doentes e resultados confiáveis em indivíduos livres da doença. A especificidade torna-se importante num teste de triagem quando se tenta diagnosticar enfermidades raras (11).

O teste de triagem estudado apresentou índice de sensibilidade muito abaixo do esperado (Tabela 3), demonstrando a ineficiência das estirpes aquáticas empregadas separadamente ou em conjunto; uma vez que a prova de referência confirmou a alta prevalência de leptospirose, esperada nos soros selecionados.

Supondo-se a falta de conhecimento prévio do painel sorológico, o índice de sensibilidade apenas de per si, não permitiria uma interpretação acurada dos resultados, pois este indicaria apenas os resultados de uma bateria de soros provenientes de uma população, sem contudo indicar a possibilidade do resultado positivo corresponder a um indivíduo doente. Essa probabilidade é determinada pelo estudo do valor preditivo (6).

Os elevados valores preditivos dos

Tabela 5 - Resultados relativos de sensibilidade (Sr), especificidade (Er), concordância (C), valores preditivo (Vp+, Vp-) e falso positivo (F+) e falso negativo (F-) da soroaglutinação microscópica, empregando-se soros animais frente a quatro estirpes de *L. biflexa*, comparados a prova de referência.

Símbolos: * prova de referência: soroaglutinação microscópica com 20 sorotipos de *Leptospira* sp.

Caract. %\Espécie	Bovina	Suína	Bubalina	Eqüina	Canina
	Sr	36,9	38,4	24,0	34,4
Er	78,8	94,5	90,0	97,9	90,6
C	70,4	64,6	48,8	72,2	64,5
Vp+	88,5	89,2	80,0	94,7	78,6
Vp-	49,5	56,6	41,5	68,6	60,4
F+	21,2	5,5	10,0	2,1	9,4
F-	33,1	61,6	76,0	65,6	63,3

Tabela 6 - Resultados de análise estatística obtidos no teste de McNemar (X) aplicados no estudo do diagnóstico sorológico da leptospirose animal com estirpes de *L. biflexa*, em relação a prova de referência.

Símbolos: χ^2 crítico = 3,84.

Especie\Estirpe	BA	PA	RU	SP	BA+PA+RU+SP
	Bovina	89,8*	89,1*	39,2*	111,1*
Suína	84,0*	75,0*	56,7*	80,0*	43,8*
Bubalina	44,0*	41,0*	42,2*	52,0*	31,6*
Eqüina	32,0*	26,0*	30,0*	30,0*	20,0*
Canina	29,0*	19,4*	29,0*	28,0*	13,1*

resultados positivos observados sugerem que embora o teste de triagem apresentasse baixa sensibilidade, seus resultados positivos possuem alta probabilidade de corresponderem aos verdadeiros infectados. Por outro lado, o mesmo teste de triagem mostrou-se bastante eficiente quando ao índice de especificidade, mas ao se impor o mesmo raciocínio anteriormente empregado, os baixos valores preditivos dos resultados negativos revelaram que os soros não reagentes nesta prova possuam baixa probabilidade de corresponderem a indivíduos não doentes. E mais uma vez esses dados foram confirmados quando comparados aos resultados obtidos pela prova de referência.

Diante desses conceitos, concluiu-se pela ineficiência das estirpes Buenos Aires, Patoc 1, Rufino e São Paulo individualmente ou em conjunto no diagnóstico de triagem da leptospirose nas espécies animais estudadas.

Referências Bibliográficas

1. Addamiano, L. & Babudieri, B. Water strains of *Leptospira* in the serodiagnosis of human and animal. Bull WHO, 39:925-34, 1968.
2. Avila, F.A.; Moreira, E.C.; Viana, F.C. Leptospira Patoc amostra patoc-1 como antígeno de triagem no diagnóstico sorológico das leptospiroses suína. Científica, 5 (3):352-55, 1977.
3. Cacchione, R.A.; Cascelli, E.A.; Martinez, E.S. *Leptospira biflexa* Rufino. Su uso en el diagnóstico de leptospirosis animal. Rev. Invest. Agrop. Ser. Cuatro. Pathol. Anim., 8:29-35, 1971.
4. Cacchione, R.A.; Cascelli, E.S.; Martinez, E.S. Avances en el diagnostic de leptospirosis animal por una puebla microscopica empleando un antígeno de *L. biflexa*, cepa Rufino. Rev. Assoc. Argent. Microbiol., 4:3-7, 1972.
5. Caldas, E.M.; Sampaio, M.R.; Costa, E.; Tishcenco, L.M. Patoc 1 and Rufino strains of *Leptospira biflexa*, as screening antigens in the diagnosis of leptospirosis. Int. J. Zoonosis, 5:91-6, 1978.
6. Camargo, M.E., 1983. Conceitos básicos sobre métodos sorológicos no diagnóstico de doenças parasitárias. São Paulo, Instituto de Medicina Tropical. (apostila).
7. Combieescu, D.; Sturdza, N.; Sefer, M.; Radu, I. Leptospiren forschungen in Rumanien. Zentralbl. Bacteriol. Parasitenc. Infectiouscr. abt.1 Orig., 173:103-6, 1958b.
8. Correa, M.O.A.; Sadatsune, T.; Fleury, G.C. Valor prático do uso da *Leptospira semaranga* patoc 1 no diagnóstico das leptospiroses humanas. Rev. Int. Med. Trop. São Paulo, 12:284-7, 1970.
9. Cox, C.D. Standardization and stabilization of an extract from *Leptospira biflexa* and its use in the hemolytic test for leptospirosis. J. Infect. Dis., 101:203-9, 1957.
10. Girio, R.J.S. Estudo comparativo de quatro cepas de *leptospiras* apatogenicas utilizadas em teste de triagem para o uso diagnóstico sorológico da leptospirose em bufalos (*Bubulus bubalis*). São Paulo, 1984. 52p. (Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
11. Griner, P.F.; Mayewski, R.J.; Mushlin, A.I.; Grenland, P. Selection and interpretation of diagnostic test and procedures. Principles and applications. Ann. Intern. Med., 94:557-600, 1981.
12. Hagiawara, M.K. Estudo comparativo entre as reações de soroaglutinação microscópica e de fixação do complemento na leptospirose canina experimental pelos sorotipos *icterohaemorrhagiae* e *canicola*. São Paulo, 1979. 56p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo).
13. Mailloux, M. Utilité de l'antigène *Leptospira biflexa* Patoc dans les serodiagnostic de leptospiroses. Ann. Inst. Pasteur (Paris), 112:121-5, 1967.
14. Organização Mundial da Saúde. Guidelines for the control of leptospirosis. WHO offset publication, 67:1-171, 1982.
15. Petelin, N.; Cinco, M.; Magliochechetti-Lombi, P. Comparative diagnostic significance of some water leptospira for human leptospirosis. Trop. Geogra. Med., 22:245-9, 1970.
16. Ribeiro, M.A.; Kawarabayashi, M.; Yamada, L.K.; Takeda, A.K.; Correa, M.O.A.

1. Immunodiagnóstico da leptospirose humana. 2. Estudo comparativo das reações de soroaglutinação microscópica, hemaglutinação passiva e imunofluorescência indireta. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 41 (2):135-143, 1981.
17. Santa Rosa, C.A. Estudo comparativo de algumas estirpes de leptospiras apatogênicas para diagnóstico da leptospirose animal. São Paulo. 31p., 1977. (Tese de Livre Docência de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo).
18. Siegel, S. Estadística no paramétrica aplicada a las ciencias de la conduta. México. Eds. Trillas, p.86-195, 1975.
19. Sturdza, N. & Ellian, M. Comparative study on different strains of *L. biflexa* as antigen for the complement fixation test in leptospirosis. Arch. Roum. Pathol. Exper. Microbiol., 20:33-41, 1961.
20. Torten, M.; Shenberg, E.; Van Der Hoeden, J. The use of immunofluorescence in the diagnosis of human leptospirosis by genus-specific antigen. J. Infect. Dis., 116:537-43, 1966.
21. Uhlenhuth, P. & Zulzer, M. Über die biologischen und immunisatorischen Beziehungen des Erregers der Weilschen Krankheit (*Spirochaeta icterogenes*) zu der feilebenden wasserspirochat (*Spirochaeta pseudoicterogenes*). Klin. Wschr., 43:2124-30, 1922.
22. Wilson, J.W. & Jungner, G. Principles and practices of screening for disease. Public Health Papers, nº 34. WHO Geneva, 1968.

Evolução dos títulos de anticorpos séricos em búfalos jovens infectados experimentalmente com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona*

Raul José Silva Girio,
Luis Antonio Mathias

Recebido para publicação em 18/05/88

Deptº de Medicina Veterinária Preventiva
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP
Campus de Jaboticabal
Rodovia Carlos Tonanni, Km 5
14870 Jaboticabal SP, Brasil

Roberto Mitio Yanaguita

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

& Antonio Cabrera Mano Filho

Médico Veterinário Autônomo

Resumo

Quatro animais da espécie bubalina, machos, mestiços, com aproximadamente seis meses de idade, foram infectados experimentalmente com uma amostra patogênica de *Leptospira interrogans* sorotipo pomona. Outros três animais, com as mesmas características, foram utilizados como grupo testemunha. O objetivo do trabalho foi pesquisar, através da prova de soroaglutinação microscópica, a evolução dos títulos de anticorpos séricos nos animais infectados. Os anticorpos homólogos começaram a aparecer em títulos detectáveis a partir do 5º dia após a inoculação. A média aritmética dos títulos de anticorpos neste dia foi de 1:33,7, sendo que no soro de dois animais os títulos encontrados foram de 1:50. Todos os animais infectados apresentaram uma elevação dos títulos de anticorpos até o 19º dia, quando a média desses títulos foi a mais alta, 1:450. O maior título aglutinante encontrado durante a pesquisa foi de 1:800, revelado no 14º e no 19º dia. Após o 19º dia os títulos começaram a cair, chegando a valores muito baixos no 100º dia, quando a média aritmética dos títulos aglutinantes foi de 1:17,5. Um animal do grupo infectado apresentou também títulos de anticorpos aglutinantes contra o sorotipo canícola.

Summary

Evolution of antibody titres in sera of young water buffaloes experimentally infected with Leptospira interrogans serovar pomona

* Projeto Financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Four male, crossbred water buffaloes, about six months old, were experimentally infected with a pathogenic strain of *Leptospira interrogans* serovar *pomona*. Three other uninoculated animals, with the same characteristics, were used as a control group. The purpose of the work was to follow the serological conversion expressed by an increase in antibody titres in the infected animals as detected by the microscopic agglutination test. Homologous antibody titres increased from the 5th day after the inoculation. On this day, the arithmetic mean of antibody titres was 1:33,7 and in the sera of two animals the titre found was 1:50. All the infected animals showed an increase of the antibody titres until the 19th day when the mean of these titres was the highest one, 1:450. The highest agglutinating titre found during the research was 1:800, revealed on day 14th and 19th. After the 19th day the titres began to decrease, reaching very low values on the 100th day, when the arithmetic mean of antibody titres was 1:17,5. One infected animal also showed agglutinating antibody titres against serovar *canicola*.

Introdução

A leptospirose é uma infecção largamente disseminada entre os animais domésticos e silvestres.

A susceptibilidade do búfalo à infecção pelos diferentes sorotipos de leptospira ainda é pouco conhecida. Em inquéritos sorológicos e isolamentos realizados em búfalos, a ocorrência do sorotipo *pomona* foi demonstrada na União Soviética (3), na Bulgária (6), na Itália (1), na Índia (8, 14) e na China (15).

No Brasil, já foram registradas na espécie bubalina, aglutininas anti-leptospira *interrogans* sorotipo *pomona*. Sandoval & Cols. (11) examinaram vários rebanhos, no Estado de São Paulo, e constataram 6,85% de positividade para leptospirose. Giorgi & Cols. (2) encontraram, em soros sanguíneos de búfalos de diferentes idades, 6,71% de animais com título positivo. Em ambos os trabalhos, o sorotipo *pomona* foi o segundo mais prevalente, sendo que o mais frequente foi o sorotipo *wolfii*.

São poucos os estudos sobre infecção experimental na espécie bubalina. Ryu & Liu (10) infectaram 14 animais jovens, oito com o sorotipo *australis* e seis com o sorotipo *canicola*. Os anticorpos homólogos foram detectados somente em um búfalo inoculado com o sorotipo *australis* e o título aglutinante máximo encontrado foi de 1:500. Com o objetivo de prepararem soro hiperimune, Palit & Sharma (7) inocularam culturas avirulentas do sorotipo *pomona* em búfalos jovens. Os soros foram testados frente às reações de soroagglutinação microscópica, fixação do complemento e hemagglutinação indireta. A prova de soroagglutinação microscópica foi a que revelou maiores títulos e o título máximo encontrado foi de 1:1.000. Ratnam & Cols. (9) inocularam três búfalos jovens com o sorotipo *icterohaemorrhagiae*. As aglutininas contra esse sorotipo alcançaram título máximo de 1:200.

Podem ser encontrados na literatura vários trabalhos sobre infecção experimental na espécie bovina. Em animais jovens, os autores relatam que a grande maioria dos animais inoculados com o sorotipo *pomona* responde sorologicamente à inoculação a partir do 5^o dia após a infecção (4, 13).

Dante da relativa escassez de trabalhos de pesquisa sobre a leptospirose bubalina, o presente estudo teve por objetivo acompanhar a evolução dos títulos de anticorpos séricos, em búfalos jovens experimentalmente infectados com o sorotipo *pomona*, de modo a se obter dados que permitam conhecer melhor o comportamento sorológico dos bubalinos infectados por esse sorotipo.

Material e Métodos

1. Inóculo - A amostra de *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*, utilizada na inoculação dos búfalos, foi cedida pelo Fromm Laboratories (EUA), através da

Salsbury Laboratórios do Brasil. Esta amostra foi cultivada em meio líquido EMJH* (Ellinghausen, McCullough, Johnson e Harris), enriquecido com soro de coelho, na proporção de 10%. Antes de inoculação, a virulência da amostra de leptospira foi ativada em cobaias jovens. Após duas passagens, as leptospires foram cultivadas durante cinco dias à temperatura de 28°C e posteriormente usadas como inóculo.

2. Animais - Utilizaram-se sete animais da espécie bubalina, machos, mestiços, com aproximadamente seis meses de idade. Aos 21, 14 e 7 dias antes da inoculação, colheu-se o sangue de todos os animais e seus respectivos soros foram submetidos à pesquisa de anticorpos anti-leptospires, pela técnica de soroaglutinação microscópica (SAM), utilizando-se como antígeno os seguintes sorotipos de *Leptospira interrogans*: *australis*, *autumnalis*, *ballum*, *bataviae*, *butembo*, *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *panama*, *pomona*, *pyrogenes*, *shermani*, *tarassovi*, *whitcombi* e *wolfii*. Procurou-se, ainda, investigar o estado de portador renal de leptospires, através da cultura de urina em meio de Fletcher*. Os animais utilizados estavam clinicamente normais, livres de anticorpos contra qualquer um dos抗ígenos de *Leptospira* empregados, e não se caracterizavam como portadores renais. Posteriormente, os animais foram distribuídos em dois grupos e submetidos a idênticas condições de manejo.

Foram feitas tentativas de reisolamento de *Leptospira* a partir da urina, diariamente, desde o primeiro até o 40º dia pós-infecção e nos dias 54º, 72º e 100º.

2.1. Animais infectados - Quatro búfalos foram infectados com a *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*. Esses animais receberam, por via subcutânea, 5ml de cultura viva contendo, aproximadamente, $1,0 \times 10^9$ leptospires por mililitro.

2.2. Animais testemunha - Três búfalos foram mantidos como grupo testemunha e receberam, através da via subcutânea, 5ml de meio EMJH estéril.

3. Colheita do sangue - Amostras de sangue para os exames sorológicos foram obtidas de todos os animais, inclusive do grupo testemunha, no 21º, 14º, 7º dia e imediatamente antes da inoculação, e no 1º, 3º, 5º, 7º, 10º, 14º, 19º, 23º, 37º, 54º, 72º e 100º dia após a inoculação.

4. Resposta sorológica - No soro sanguíneo de cada bubalino, inclusive os testemunhas, pesquisou-se anticorpos contra o sorotipo *pomona*, através da prova de soroaglutinação microscópica - SAM (12). Além disto, foram pesquisados títulos de anticorpos contra os sorotipos *australis*, *autumnalis*, *ballum*, *bataviae*, *butembo*, *canicola*, *grippotyphosa*, *icterohaemorrhagiae*, *javanica*, *panama*, *pyrogenes*, *shermani*, *tarassovi*, *whitcombi* e *wolfii*, na tentativa de verificar a eventual ocorrência de reações paradoxais.

Resultados

Os resultados revelados pela prova de SAM nos soros sanguíneos de búfalos infectados com a *Leptospira interrogans* sorotipo *pomona*, são mostrados na Figura 1 e na Tabela 1. Os anticorpos séricos começaram a aparecer em títulos detectáveis a partir do 5º dia após a inoculação. A média aritmética dos títulos de anticorpos neste dia foi de 1:33,7, sendo que, no soro dos animais de números 2 e 3 os títulos encontrados foram maiores, 1:50 e no animal de número 4 o título foi menor, 1:10. Todos os animais infectados apresentaram uma elevação dos títulos de anticorpos até o 19º dia, quando a média dos títulos encontrados foi a mais alta, 1:450. Pela Tabela 1, observa-se ainda que o maior título aglutinante encontrado durante o experimento foi de 1:800, revelado no 14º e no 19º dia, no soro dos animais 3 e 1, respectivamente. Após o 19º dia, os títulos começaram a declinar, chegando a valores muito baixos no 100º dia, quando a média aritmética dos títulos aglutinantes foi de 1:17,5.

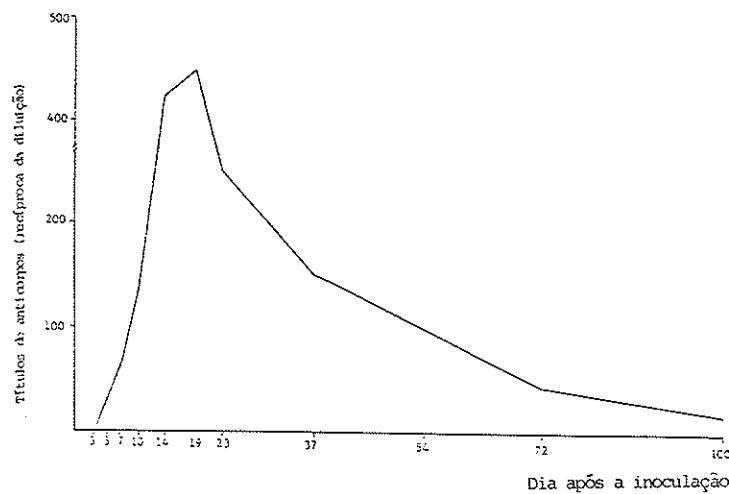
Um dos animais infectados apresentou também títulos de anticorpos contra o

Tabela 1 - Títulos de anticorpos séricos* revelados pela reação de soroaglutinação microscópica, contra a *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, em búfalos inoculados com o mesmo sorotipo.

Símbolos: * = Recíproca da diluição; ** = Recíproca da diluição correspondente à média aritmética dos títulos obtidos.

Número do Animal	Dias após a inoculação													
	0	1	3	5	7	10	14	19	23	37	54	72	100	
1	-	-	-	-	25	50	100	400	800	400	200	100	50	25
2	-	-	-	-	50	100	200	400	400	200	100	100	50	10
3	-	-	-	-	50	100	200	800	400	200	200	100	50	25
4	-	-	-	-	10	25	50	100	200	200	100	100	25	10
\bar{x}^{**}	-	-	-	-	33,7	68,7	137,5	425	450	250	150	100	43,7	17,5

Figura 1 - Médias aritméticas dos títulos de anticorpos revelados pela reação de soroaglutinação microscópica, contra *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, em búfalos inoculados com o mesmo sorotipo.



sorotipo canícola. Esse título surgiu no 14º dia após a inoculação atingiu seu auge (1/200) no 23º dia, declinado em seguida, até o 72º dia, quando não foi mais observado.

O reisolamento de leptospira somente foi possível a partir da urina de um dos búfalos do grupo infectado, e em apenas uma oportunidade, no 17º dia após a infecção.

Em nenhuma ocasião foram observados títulos de anticorpos aglutinantes no soro sanguíneo dos animais do grupo controle, contra os 16 sorotipos estudados, assim como não foi isolada leptospira a partir da urina desses animais.

Discussão

No grupo de búfalos infectados com *Leptospira interrogans* sorotipo pomona, os

anticorpos séricos apareceram no 5º dia após a inoculação e os maiores títulos aglutinantes, 1:800, foram detectados no 14º e no 19º dia após a inoculação. Entre o 7º e o 54º dia, animais do grupo infectado apresentaram títulos aglutinantes suficientes para serem classificados como positivos na rotina do diagnóstico sorológico para leptospirose, através da prova de aglutinação microscópica (Tabela 1). Em trabalhos experimentais realizados anteriormente, Sleight & Cols. (13) encontraram anticorpos homólogos no soro de bovinos jovens no 5º dia após a inoculação com o sorotipo pomona, tendo verificado títulos superiores a 1:1.000 entre o 12º e o 23º dia, enquanto que Hoges & Ris (4) observaram o início da resposta sorológica em bezerros no 7º dia após a inoculação, e o maior título, 1:30.000, foi determinado no 10º dia. Na espécie bubalina, Ryu & Liu (10) e Ratman & Cols. (9) verificaram, através de seus experimentos, que os sorotipos *australis* e *icterohaemorrhagiae*, respectivamente, induziram em búfalos, níveis baixos de anticorpos. O maior título aglutinante foi observado, em ambos os experimentos, na segunda semana após a inoculação. Resultados diferentes foram encontrados por Palit & Sharma (7) em soros sanguíneos de búfalos jovens que receberam várias inoculações com amostras avirulentas do sorotipo pomona. Através da prova de SAM, estes autores observaram títulos homólogos de 1:1.000 a partir da segunda semana após a última inoculação. Essa diversidade entre os vários estudos realizados, incluindo o presente trabalho, pode ser explicada por diversos fatores, entre os quais, a espécie estudada, as diferenças individuais de resposta imunológica ao mesmo estímulo, a imunogenicidade da amostra utilizada na inoculação e os critérios adotados nas diluições do soro.

Outro lado interessante verificado no trabalho foi o fato de um dos animais infectados com o sorotipo pomona ter apresentado títulos sorológicos também contra o sorotipo canicola entre os dias 14º e 54º após a infecção, sendo que estes foram inferiores aos títulos obtidos contra o sorotipo homólogo. De acordo com Kmety (5) essas reações ocorrem mais frequentemente entre o 6º e o 14º dia da doença. Embora o título tenha surgido em apenas um animal e o sorotipo canicola não seja dos mais frequentemente encontrados em bubalinos, não se pode assegurar que tal título deva-se a uma reação paradoxal, uma vez que não se pode excluir a possibilidade de o animal, mantido sob condições de campo, ter se infectado naturalmente com o sorotipo canicola.

Referências Bibliográficas

1. Andreani, E.; Vaccaro, A. & Roperti, C. - Indagini sulla frequenza e diffusione delle leptospirose nei bufali in Campania. Atti. Soc. Ital. Sci. Vet., 28:762-765, 1974.
2. Giorgi, W.; Teruya, J.M.; Silva, A.S. & Genovez, M.E. - Leptospirose: Resultados das soro-aglutinações realizadas no Instituto Biológico de São Paulo, durante os anos de 1974/1980. Biológico, 47(11):299-309, 1981.
3. Gorshanova, E.N. - Epidemiological importance of cattle, buffalo, sheep, goat and pig in the spread of leptospirosis. J. Microbiol., (10):107-112, 1961.
4. Hoges, R.T. & Ria, D.R. - Complement fixing and agglutinating antibody responses and leptospiruria in calves inoculated with *Leptospira* serotype pomona, hardjo, copenhageni or ballum. New Zealand Vet. J., 22:25-30, 1974.
5. Kmety, E. Betrachtungen zum problem du paradoxaen rektion und deren bedeutung in der serodiagnostik einiger leptospirosen. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 170:597-608, 1958.
6. Kujungiev, I. - La leptospirosi dei bufali. Vet. Ital., 14:790-800, 1963.
7. Palit, A. & Sharma, G.L. - Comparison of microscopic agglutination, indirect haemagglutination and complement fixation test in rabbit and buffalo-calf hyperimmune sera for detection of leptospiral antibodies. Br. Vet. J., 127:154-162, 1971.
8. Rao & Keshavamurthy, B.S. - Serological evidence of leptospiral infection in buffaloes. Indian J. Comp. Microbiol., Immunol. and Infect. Dis., 3(3):147-152, 1982.

9. Ratman, S.; Subramanian, S. & Adinarayanan, N. - Immunological responses to leptospirosis in experimentally infected buffalo calves. *Cherion*, 12(6):287-289, 1983.
10. Ryu, E. & Liu, C.K. - Studies on the susceptibility of water buffaloes to leptospira. *Can. J. Comp. Med.*, 32:447-449, 1968.
11. Sandoval, L.A.; Arruda, N.M.; Teruya, J.M.; Giorgi, W.; Amaral, L.B.S. & Mazanti, M.T. - Pesquisas em bubalinos: Prevalência da brucelose e leptospirose no Estado de São Paulo, Brasil. *Biológico*, 45(11/12): 209-212, 1979.
12. Santa Rosa, C.A. - Diagnóstico laboratorial das leptospiroses. *Rev. Microbiol.*, 1(2):97-100, 1970.
13. Sleight, S.D.; Atallah, O.A. & Steinbauer, D.J. - Experimental *Leptospira pomona* infection in bulls. *Am. J. Vet. Res.*, 25(109):1663-1668, 1964.
14. Upadhye, A.S.; Krishnappa, G. & Naveed Ahmed, S. - Leptospiral antibodies in aborted buffaloes. *Indian Vet. J.*, 58(8):671, 1981.
15. Xu, J.P.; Pian, R.L.; Mao, J.S.; Wu, S.Y. & Quian, H.L. - A survey of leptospiral abortions in buffaloes. *Chinese J. Vet. Med.*, 9(1):19-20, 1983.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE COLICINAS EM AMOSTRAS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE URINA E FEZES*

Márcia do Rocio Duarte

Deptº de Fármacia

UFPR

Rua Cel. Dulcídio, 638
80230 Curitiba PR, Brasil

Recebido para publicação em 14/06/88

Resumo

Em amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes determinaram-se os níveis de resistência à ampicilina (Ap), amicacina (Am), canamicina (Km), estreptomicina (Sm), gentamicina (Gm), tetraciclina (Te), ao ácido nalidíxico (Nx) e cloranfenicol (Cm); pesquisaram-se plasmídeos R e a capacidade de produção de colicinas. Nas 120 amostras analisadas, 22,5% foram sensíveis, 20,0% monorresistentes e 57,5% polirresistentes aos antimicrobianos ensaiados. Os modelos de resistência mais freqüentemente observados foram: ApCmKmSmTe (11,8%), Te (10,8%) e ApCmSmTe (8,6%). Não foi constatada diferença significativa entre amostras mono e polirresistentes quanto a origem. No entanto, a proporção de amostras resistentes isoladas de urina foi maior que a de fezes, em relação à ampicilina, estreptomicina e ao cloranfenicol. Foi observada associação de marcas nos casos de simultaneidade de resistência à ampicilina, canamicina, tetraciclina e ao cloranfenicol, e transferência parcial e total destas através de conjugação. Foram produtoras de colicinas 18,3% das amostras, não tendo sido encontrada diferença significativa na freqüência de colicinogénica quanto a origem. Entretanto, foi observada uma maior tendência da capacidade colicinogênica nas amostras monorresistentes, particularmente estreptomicina-resistentes.

Summary

Drug resistance and colicin production in Escherichia coli isolated from urine and faeces

The present research was carried out to test *Escherichia coli* from urine and faeces for resistance level to ampicillin, amikacin, kanamycin, streptomycin, gentamicin, tetracycline, nalidixic acid and chloramphenicol. The presence of R plasmids and colicin production was also investigated. Of 120 samples tested, 22.5% were sensitive, 20.0% were resistant to one drug and 57.5% to several drugs. The most frequent profiles were; ApCmKmSmTe (11.8%), Te (10.8%) e ApCmSmTe (8.6%). There was no statistical difference between the frequencies of single and multiple resistance regarding the origin of the material. Nevertheless, the proportion of resistant samples was higher among those taken from urine than the ones from faeces in relation to ampicillin, streptomycin

* Resumo da Tese de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética da UFPR.

and chloramphenicol. A positive correlation was noted among ampicillin, chloramphenicol, kanamycin and tetracycline as well as partial or total transfer of these resistance markers by conjugation. 18.3% of the samples were colicin producers. No statistical difference was found concerning colicinogenic frequency between the samples from urine and those from faeces. However, a certain association between colicinogeny and single resistant samples was noted, particularly those resistant to streptomycin.

Introdução

A modalidade de resistência a antimicrobianos conferida por genes extracromossómicos é denominada de resistência infecciosa. Em geral é múltipla, envolvendo simultaneamente, dois ou mais antimicrobianos não relacionados e de importância terapêutica (5). A resistência infecciosa é determinada por elementos genéticos denominados de plasmídeos R (11, 14,) os quais são passíveis de transferência entre células bacterianas, a semelhança dos plasmídeos colicinogênicos ou Col. Estes condicionam a produção de colicinas (12), sintetizadas por *Escherichia coli* e outras enterobactérias, que atuam sobre o crescimento de linhagens da mesma espécie ou diferentes.

Em amostras de *E. coli* isoladas de urina, como agente infeccioso, e de fezes, como integrante da flora intestinal normal, o presente trabalho objetivou: (1) determinar os níveis de resistência das amostras frente a oito antimicrobianos; (2) verificar a natureza dessa resistência através da pesquisa de plasmídeos R; (3) investigar a produção de colicinas; e (4) comparar os resultados entre as amostras isoladas de urina e fezes.

Material e Métodos

Amostras bacterianas - Foram utilizadas 120 amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina (64 amostras) e fezes (56 amostras) de 120 pacientes ambulatoriais, com idade entre 0 e 15 anos, do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Hospital Pequeno Príncipe e Hospital da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba, durante o período de agosto a dezembro de 1983.

As amostras isoladas de urina foram selecionadas de pacientes cuja contagem de colônias em urinocultura foi igual ou superior a 10^5 /ml, e as de fezes de pacientes sem infecção urinária, foram caracterizadas como integrantes da flora normal. Salientando-se que aquelas oriundas de crianças com até 5 anos de idade, foram diferenciadas de *E. coli* enteropatogênicas clássicas (EPEC) através de sorotipagem.

A linhagem *E. coli* K12 (não fermentadora da lactose, resistente a 500 μ g/ml de estreptomicina e 1 μ g/ml de ampicilina, e sensível a 1 μ g/ml de canamicina, tetraciclina e cloranfenicol) foi empregada como receptora no processo de conjugação e indicadora na verificação de produção de colicinas.

Resistência a antimicrobianos - Os antimicrobianos ensaiados, cuja potência foi controlada através da linhagem *E. coli* BH100, foram: ácido nalidíxico (Nx) - Winthrop Products Inc.; ampicilina sódica (Ap) - Laboratório Lepetit S.A.; cloranfenicol (Cm) - Farmitalia Carlo Erba S.A.; sulfato de amicacina (Am) - Laboratórica Bristol S.A.; sulfato de canamicina (Km) - Laboratórica Bristol S.A.; sulfato de estreptomicina (Sm) - Indústria Farmacêuticas Fontoura-Wyeth S.A.; sulfato de gentamicina (Ge) - Abbott Laboratórios do Brasil Ltda. e tetraciclina (Te) - Laboratórica Bristol S.A.

Os níveis de resistência foram determinados pela técnica de diluição em placas (20), utilizando-se ágar nutritivo (Merck), adicionado das soluções de antimicrobianos preparadas de acordo com Biagi (2), e obtendo-se as concentrações finais de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 μ g/ml. Considerou-se como concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração do antimicrobiano que impedi o crescimento da amostra bacteriana e como nível de resistência a

concentração imediatamente inferior (15). As amostras foram classificadas como sensíveis ou resistentes segundo o método descrito por Trabulsi & Col. (21).

Transferência das marcas de resistência - Foi realizada através do processo de conjugação, de acordo com a técnica de Moreno (15) modificada. A amostra receptora *E. coli* K12 e as possíveis doadoras selecionadas foram cultivadas a 37°C por 18 a 20 horas em caldo nutritivo (BBL) sem agitação, e posteriormente, aliquotas das culturas mistas foram semeadas em placas controles e seletoras. O meio empregado nesta etapa foi ágar EMB (BBL) adicionado de 20µg/ml de estreptomicina, 50µg/ml de ampicilina, 50µg/ml de cloranfenicol, 2µg/ml de canamicina e 10µg/ml de tetraciclina. A leitura das placas foi feita após 24 horas de incubação.

Produção de colicinas - Procedeu-se de acordo com a técnica de Costa (7) modificada, utilizando-se como linhagem indicadora *E. coli* K12. As amostras foram semeadas em placas contendo ágar nutritivo (Merck), incubadas a 37°C por 48 horas, e posteriormente irradiadas com luz ultravioleta durante 10 segundos e reincubadas a 37°C por 24 horas. Adicionou-se às placas ágar nutritivo semi-sólido (BBL) previamente inoculado com *E. coli* K12, e após incubação a 37°C por 24 horas, observou-se a presença ou ausência de halo de inibição.

Análise estatística - Foi realizada através de aplicação do teste de qui-quadrado (χ^2), aceitando-se o nível de significância de 5%, e emprego de coeficiente de correlação fi (ϕ), como medida do grau de associação de variáveis.

Resultados e Discussão

Resistência a antimicrobianos - A Tabela 1 apresenta a frequência para cada nível de resistência de 120 amostras de *E. coli* frente aos antimicrobianos ensaiados. Sua análise revelou que as amostras apresentaram uma ampla variabilidade de níveis de resistência frente à ampicilina, canamicina e tetraciclina, uma vez que se encontraram amostras enquadradas em quase todas as concentrações do antimicrobiano. Outros antimicrobianos revelaram menor variabilidade em relação aos níveis de resistência. Para o cloranfenicol, a distribuição das amostras apresentou-se mais intensa nas concentrações intermediárias e altas, indicando ser elevada a resistência de *E. coli* a esse antimicrobiano. Já para o ácido nalidíxico, amicacina e gentamicina as amostras apresentaram-se essencialmente sensíveis ao efeito inibitório desses antimicrobianos. Com base nessa constatação, pode-se sugerir que esses antimicrobianos seriam efetivos contra *E. coli*. A observação do efeito inibitório do ácido nalidíxico e da gentamicina foi concordante com os resultados apresentados por Trabulsi & Col. (21), Souza (18), Silva & Col. (17), Teixeira & Col. (19), Dias & Hofer (8) e Cisneros-Benavides & Gomes-Eichelmann (6).

Tabela 1 - Número de amostras de *Escherichia coli* isoladas de urina e fezes, dispostas segundo os níveis de resistência apresentados frente a oito antimicrobianos.

Símbolos: () = Amostras isoladas de urina.

Níveis de Resistência (µg/ml)	Antimicrobianos							
	Nx	Ap	Cm	Am	Km	Sm	Ge	Te
< 1	83(47)	2(2)	0	115(62)	83(40)	45(16)	110(56)	47(21)
1	25(13)	7(5)	0	4(1)	1(0)	11(4)	2(2)	2(0)
2	7(2)	38(14)	0	0	2(2)	14(8)	6(4)	2(1)
5	0	4(2)	0	1(1)	11(6)	12(6)	1(1)	1(1)
10	0	3(1)	1(1)	0	12(8)	35(27)	1(1)	1(1)
20	1(1)	4(0)	52(21)	0	2(1)	3(3)	0	17(13)
50	2(1)	0	9(5)	0	6(5)	0	0	28(16)
100	2(0)	4(0)	2(1)	0	1(1)	0	0	12(6)
200	0	3(2)	2(2)	0	1(1)	0	0	9(4)
500	0	13(9)	2(1)	0	0	0	0	1(1)
1000	0	42(29)	52(33)	0	1(0)	0	0	0

Tabela 2 - Número e porcentagem de amostras de *Escherichia coli* classificadas como sensíveis, mono e polirresistentes frente a oito antimicrobianos, dispostas segundo o material de origem.

Amostras	Origem		Total	
	Urina	Fezes	Nº	%
Sensíveis	8	19	27	22,5
Monorresistentes	12	12	24	20,5
Polirresistentes	44	25	69	57,5
Total	64	56	120	100,0

No presente trabalho, os níveis de resistência das populações sensíveis e resistentes aproximaram-se dos descritos por Trabulsi & Col. (21), excetuando-se o cloranfenicol. Neste caso os autores relataram uma distribuição preferencial das amostras nas concentrações baixas e intermediárias. Tais resultados indicaram que, durante o período de 1970 a 1983, processou-se a seleção de amostras resistentes ao cloranfenicol.

A frequência de amostras resistentes (Tabela 2), comparativamente a relatada por Souza (18), que realizou pesquisa semelhante em Belo Horizonte, foi consideravelmente maior. Talvez tivesse sido ainda maior, caso a resistência a sulfas fosse ensaiada, permitindo detectar amostras exclusivamente sulfa-resistentes, dentre as consideradas sensíveis. Portanto, os dados obtidos estariam mais próximos dos relatados por Silva & Col. (17), Dias & Hofer (8) e Dias & Col. (9), que constataram elevadas frequência de resistência em enterobactérias.

Os resultados demonstraram que a proporção de amostras resistentes isoladas de urina foi maior do que a proporção das isoladas de fezes ($\chi^2=6,68$ $p<0,01$). Entretanto, comparando-se o número de marcas de cada amostra resistente quanto a origem, não se observou diferença entre mono e polirresistência ($\chi^2=2,04$ $p>0,05$). Analisando-se as marcas isoladamente, constatou-se que a frequência diferencial de resistência foi devida a um maior número de amostras de urina resistentes à ampicilina, estreptomicina e ao cloranfenicol (Tabela 3). A frequência dessas marcas nas amostras teria resultado de pressão seletiva decorrente do grande emprego de ampicilina na terapêutica de infecções urinárias. As marcas estreptomicina e cloranfenicol estariam sendo selecionadas indiretamente, na suposição de estarem presentes no mesmo plasmídeo. O maior número de amostras resistentes foi observado com relação à tetraciclina, seguindo-se em ordem decrescente, a ampicilina e o cloranfenicol. Concordantemente, essas marcas foram destacadas por Sant'Ana & Souza (16), Dias & Hofer (8), Dias & Col. (9) e Cisneros-Benavides & Gomes-Eichelmann (6) entre as mais frequentemente observadas.

Nas 93 amostras classificadas como resistentes, pôde-se detectar 33 modelos distintos de resistência, variando os perfis de resistência a um até seis antimicrobianos. Os modelos mais freqüentes foram: ApCmKmSmTe (11,8%), Te (10,8%) e ApCnSmTe (8,6%).

Numa tentativa de se verificar o grau de associação entre marcas de resistência, os antimicrobianos foram correlacionados dois a dois, tendo sido constatada associação fraca a moderada nos casos de simultaneidade de resistência à ampicilina, canamicina, tetraciclina e cloranfenicol. Essa correlação poderia ser explicada supondo-se que essas marcas estariam próximas no mesmo plasmídeo R. Contudo, procedendo-se à conjugação, foi observada transferência parcial e total das mesmas para receptora *E. coli* K12, numa proporção considerada baixa, já que de 16 amostras selecionadas como possíveis doadoras, apenas quatro transferiram as

Tabela 3 - Número de amostras de *Escherichia coli* resistentes e sensíveis frente a oito antimicrobianos, classificadas segundo o material de origem, e valor do teste de χ^2 .

Símbolos: ns = Não significativo; * = $p<0,05$; ** = $p<0,01$; () = Amostras classificadas como sensíveis.

Antimicrobiano	Origem		χ^2
	Urina	Fezes	
Nx	2(62)	3(53)	ns
Ap	40(24)	22(34)	5,55*
Cm	36(28)	20(36)	4,27*
Am	1(63)	0(56)	ns
Km	24(40)	12(44)	ns
Sm	30(34)	8(48)	13,19**
Gm	6(58)	2(54)	ns
Te	41(23)	27(29)	ns

Tabela 4 - Número e porcentagem de amostras de *Escherichia coli* colicinogênicas e não colicinogênicas frente a *Escherichia coli* K12, classificadas segundo o material de origem.

Amostras	Origem		Total	
	Urina	Fezes	Nº	%
Colicinogênicas	13	9	22	18,3
Não colicinogênicas	51	47	98	81,7
Total	64	56	120	100,0

$$\chi^2 = 0,13 \quad p > 0,05$$

Tabela 5 - Número de amostras de *Escherichia coli* sensíveis, mono e polirresistentes classificadas como colicinogênicas e não colicinogênicas.

Amostras	Colicinogênicas	Não colicinogênicas	Total
Sensíveis	6	21	27
Monorresistentes	9	15	24
Polirresistentes	7	62	69
Total	22	98	120

marcas de resistência, das quais, duas transferiram o modelo completo. Inúmeros fatores podem explicar a dificuldade na transferência de plasmídeos R, tais como: a linhagem receptora utilizada; perda expontânea de marcas; presença de dois ou mais plasmídeos R na célula doadora, sendo um deles incapaz de transferir marca para a receptora; ou dissociação de plasmídeos R co-integrados.

A análise dos resultados demonstra que o problema de resistência a antimicrobianos se estaria agravando devido ao seu uso crescente e indiscriminado, como por exemplo, no tratamento de enfermidade, na suplementação de alimentos e rações, na prática de automedicação, aliados à falta de orientação higiênico-sanitária à comunidade.

Produção de colicinas - A frequência de colicinogénia obtida (Tabela 4), de um modo geral, foi inferior aos dados de Braude & Siemienksi (3, 4), Souza (18) e Araujo & Komatsu (1). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de outras amostras portarem o caráter colicinogênico, uma vez que se utilizou somente uma linhagem indicadora para verificação da produção de colicinas. Com relação às amostras classificadas como colicinogênicas, 13 foram isoladas de urina e nove de fezes, não sendo observada diferença significativa quanto a origem ($\chi^2=0,13 \quad p>0,05$). Tal constatação foi sugestiva de que a produção de colicinas não favorece a implantação de linhagens colicinogênicas em ambiente extra-intestinal, particularmente do trato urinário. Entretanto, esses resultados diferem dos obtidos por Braude & Siemienksi (3, 4), Hardy (10) e Souza (18).

Correlação entre resistência a antimicrobianos e colicinogénia - Dentre as 93 amostras classificadas como resistentes, 16 apresentaram-se, simultaneamente, resistentes e colicinogênicas, conforme dados da Tabela 5. Correlacionando-se a resistência com a produção de colicinas, foi constatada uma maior tendência à capacidade colicinogênica nas amostras monorresistentes ($\chi^2=7,53 \quad p<0,01 \quad \phi=0,28$), particularmente Sm-resistentes. Resultados semelhantes foram apresentados por Lewis (13) e Souza (18), que em populações de *E. coli* observaram simultaneidade de caracteres relativamente à colicinogénia e monorresistência a antimicrobianos. De modo constante, todos que estudaram as características que conferem vantagem seletiva às populações bacterianas, foram concordantes em colocar que o problema é de difícil interpretação.

Agradecimentos

A autora agradece à valiosa orientação do Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo e do Prof. Dr. Newton Freire-Maia durante a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. Arai, T. & Komatsu, S. Distribution of the colicinogenic strains and the heat stability of their colicins. *Keio J. Med.*, 30:83-7, 1981.
2. Biagi, C.M.R. - Práticas de microbiologia e imunologia. Publicação Faculdade de Ciências Biológicas de Araras, 113p., 1980.
3. Braude, A.I. & Siemienski, J.S. The influence of bacteriocins on resistance to infection by Gram-negative bacteria. I. The effect of colicin on bactericidal power of blood. *J. Clin. Invest.*, 44:849-59, 1965.
4. Braude, A.I. & Siemienski, J.S. The influence of bacteriocins on resistance to infection by Gram-negative bacteria. II. Colicin actions, transfer of colicinogeny, and transfer of antibiotic resistance in urinary infections. *J. Clin. Invest.*, 47:1763-73, 1968.
5. Campos, C.E.O.P.; Azevedo, J.L. & Costa, S.O.P. - Aspectos genéticos e clínicos da resistência bacteriana a drogas. *Ars Cvrandi*, 9:16-36, 1976.
6. Cisneros-Le Navides, M.E. & Gomes-Eichelmann, M.C. Transferencia y resistencia al suero en cepas Gram-negativas multiresistentes a las drogas antimicrobianas. *Rev. Lat.-Amer. Microbiol.*, 29:27-33, 1987.
7. Costa, S.O.P. - Produção de colicinas em *Escherichia coli* e ação de enzima proteolítica bacteriana sobre colicina. In: Azevedo, J.L. & Costa, S.O.P. Exercícios práticos de genética. São Paulo, Ed. Nacional, p.186-8, 1973.
8. Dias, J.C.A.R. & Hofer, E. - Bactérias gram negativas resistentes a antimicrobianos em alimentos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 80:411-21, 1985.
9. Dias, J.C.A.R.; Vicente, A.C.P. & Hofer, E. - Coliformes fecais em águas de esgoto. I. Resistência a antibióticos, metais pesados e colicinogenia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 82:335-43, 1987.
10. Hardy, K. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.*, 39:464-515, 1975.
11. Hardy, K. Bacterial Plasmids. In: Cola, J.A. & Knowles, C.J. Aspects of microbiology. Hong Kong, Thomas Nelson and Sons, v.4., 1981.
12. Konisky, J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.*, 36:125-44, 1982.
13. Lewis, M.J. Transferable drug resistance and other transferable agents in strains of *Escherichia coli* from two human populations. *Lancet*, 1:1389-93, 1968.
14. McCombie, W.R.; Hansen, J.B.; Zylstra, G.J.; Maurer, B. & Olsen, R.H. *Pseudomonas streptomycin* resistance transposon associated with R-plasmids mobilization. *J. Bacteriol.*, 155:40-8, 1983.
15. Moreno, G. - Resistência infeciosa a drogas em amostras de *Escherichia coli* isoladas de animais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:47-55, 1972.
16. Sant'Ana, Y.X. & Souza, E.C. Plasmids that simultaneously carry markers for colicinogeny and resistance to tetracycline in *Salmonella typhimurium*. *Rev. Bras. Genet.*, 8:231-9, 1985.
17. Silva, M.L.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.*, 14:254-8, 1983.
18. Souza, E.C. - Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, 79p., 1975. Tese, Mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais.
19. Teixeira, L.M.; Suassuna, I.R. & Suassuna, I. - Resistência a antimicrobianos em amostras de *Shigella* isoladas no Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.*, 15:231-8, 1984.
20. Trabulsi, L.R. & Zuliani, M.E. - Estudos sobre a *Escherichia coli* 0111:B4. III. Sensibilidade in vitro à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 11:323-34, 1969.
21. Trabulsi, L.R.; Zuliani, M.E. & Toledo, M.R.F. Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963 and 1968. *Rev. Microbiol.*, 1:71-7, 1970.

CULTURAL CONDITIONS AND DEVELOPMENT OF *ELLISOMYCES ANOMALUS*^{*}

Galba Maria de Campos-Takaki

Deptº de Antibióticos
 Centro de Ciências Biológicas
 Universidade Federal de Pernambuco
 50739 Recife PE, Brasil

Recebido para publicação em 17/12/86

& Gordon W. Beakes

Department of Plant Biology
 University of Newcastle Upon Tyne
 NE 1 7 RU, U.K.

Summary

The development of *Ellisomyces anomalus* is dependent on the medium and carbon source. The radial growth is fairly correlated to glucose concentration in the medium. It was observed that the growth is related to chlamydospore formation. Anaerobiosis presented no effect on radial growth and chlamydospore formation. Continuous white light did not influence the development of the colony, but, chlamydospore formation is accompanied by carotenoid-like pigmentation.

Resumo**Condições culturais e desenvolvimento de *Ellisomyces anomalus***

O desenvolvimento de *Ellisomyces anomalus* é dependente do meio de cultura e da fonte de carbono. O crescimento radial está intimamente correlacionado com a concentração de glicose no meio de cultura. O crescimento radial está relacionado com a formação de clamidósporos. Anaerobiose não apresenta nenhum efeito no crescimento radial e na formação de clamidósporos. A luz branca não influência no desenvolvimento da colônia, porém a formação de clamidósporos é acompanhada pela produção de pigmentos carotenóide.

Introduction

The preliminary investigation described *Ellisomyces anomalus* as *Thamnidium anomalus* Hesseltine & Anderson (10). This species grown on potato dextrose agar (PDA), soil extract agar, synthetic medium for Mucorales (SMA), Malt agar and Czapek agar showed on evidence of sporangium formation (10).

Beny & Benjamin (5) redescribed *E. anomalus* which differs from the other species of Thamniidiaceae, mainly by abundant thallospore production from even the earliest stages of development of the colony, and its referred to as chlamydospores. So, the authors established the genus *Ellisomyces* for the species, due to this irregular behaviour.

Recent investigation (4) has demonstrated ultrastructural detailed of the thallospore development and thallospore formation and germination. The studies suggested that the spores in *E. anomalus* resemble mucorelan aethospore similar to *Mucor rouxii* described by Barrera (2). Otherwise, the nutricional requirements of

* This work was carried out in the Department of Plant Biology, The University of Newcastle upon Tyne, U.K.

arthrospore formation in *M. rouxii* were evidenced by Bartinicki-Garcia & Nickerson (3). The present study with the effect of different media, carbon source, and concentration of glucose on the development of *E. anomalous* attempts to be involved in the control of chlamydospore formation.

Material and Methods

E. anomalous, isolate SPC 0345, used in this work was kindly supplied by the Instituto de Botânica de São Paulo, Brasil. The organism was maintained on SMA at 25°C. A 5mm diameter agar disc obtained from 3 days old culture was used throughout as inoculum for different media: SMA (4% glucose, 0.2% asparagine, 0.5% potassium phosphate, 0.025% magnesium sulphate, 0.0005% thiamine, 2% agar); MSMA (1% glucose, 0.4% sodium nitrate, 0.05% potassium phosphate, 0.05% magnesium sulphate, 0.0005% thiamine, 2% agar); PDA 2% glucose (commercial preparation obtained from DIFCO); Malt agar (2% malt extract, 2% glucose, 0.1% peptone, 2% agar) and PYE (0.5% peptone, 0.1% yeast extract, 0.0001% ferric phosphate, 2% agar).

The effect of different carbon sources was studied using SMA and replacing glucose by: galactose, mannose, xylose, fructose and maltose. Different concentrations of glucose (0.06, 0.125, 0.25, 0.5 and 1%) were also tested. In all experiments the pH was 6.5 and the cultures were incubated at 25°C under continuous white light or darkness. The effect of suppression of aerobic metabolism under N₂ atmosphere was analyzed using different media and glucose concentration.

Carotenoid-like pigments were extracted with methanol and saponified with KOH for 15h. After collection in hexane the pigments were chromatographed on silica gel thin layer using the following solvent system: hexane, benzene; n-butanol; (10:1:1) and hexane benzene (10:1:5). Carotenoids were evidenced by Carr-Price test (9).

The growth was estimated measuring the diameter of the colony.

Results and Discussion

In general the therm chlamydospores is used to demonstrate that the process of thin-walled areas of the mycelium are converted into thick walled chlamydospore (7). The present paper shows the mechanism of chlamydospore induction in *E. anomalous* by environmental factors. The radial growth of *E. anomalous* on different media is shown in Figure 1. The growth on MSMA, PDA and PYE was similar although on Malt agar and SMA the development was slightly diminished. This inhibition of radial

Figure 1 - Effect of different media on radial growth of *Ellisomyces anomalous*. The incubation was carried out at 25°C under continuous light. (□ PYE; ● MSMA; △ PDA; ▲ Malt agar; ○ SMA). Similar results were found in darkness.

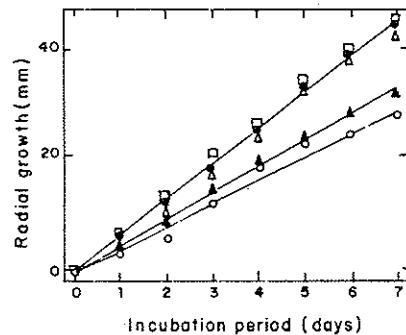
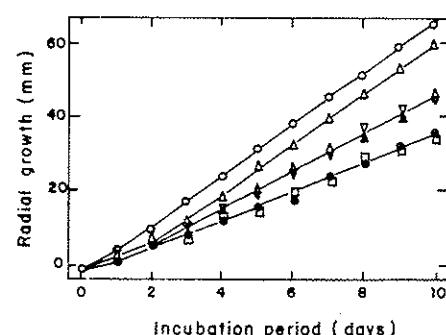


Figure 2 - Effect of different sugars on radial growth of *E. anomalous*. (○ - control without sugar; △ - galactose; ▲ - xylose; ▽ - mannose; ▾ - fructose; ● - glucose; □ - maltose).



growth is accompanied by emergent increase of the chlamydospore number. Although the growth rate is different it was observed that chlamydospore started to appear in the third day of incubation, except on PYE where no chlamydospore was formed. It was observed that light did not affect the growth of *E. anomalous*, but the exposition to continuous light undected carotenoid-like pigmentation (positive Carr-Price test, Hashimoto & Col. (9) except on PYE. This pigmentation was pronounced on Malt agar and SMA suggesting the chlamydospore formation under light is accompanied by carotenoid production.

The biosynthesis of carotenoid pigments is photoregulated in a wide range of organism. So several different types of photoreceptors are used in nature to regulate carotenogenesis (8). In fungi and bacteria, photocontrol of carotenogenesis, except to *Verticillium agaricinum* (17), is controlled by phophirin or a blue light absorbing pigment (8). In *Phycomyces*, a large amount of carotenoid pigment is produced in the dark and the light exposition increase the level of pigment produced (12). In other fungi, such as *Fusarium aquaeductum*, *Neurospora crassa* and *V. agaricium* the carotenoid production is under strict photocontrol (15).

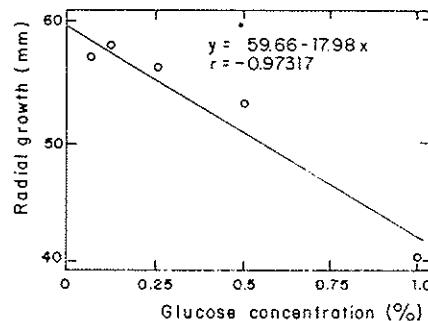
Hashimoto & Col. (9) observed the same correlation between arthosporulation and carotenogenesis in *Trichophyton mentagrophytes*. However, they did not find correlation between light exposition and pigmentation. The same fact was observed in *E. anomalous* between chlamydospore formation and carotenogenesis. However, in this fungi, the results suggested that the continuous light induces carotenoid biosynthesis under strict photocontrol, but the growth and spores formation are not affected.

The fungi can utilize a wide range of carbon sources to supply energy and carbon needed for the synthesis of compounds which comprise the living cell (16). It was observed that mannose, xylose, fructose and mainly maltose and glucose presented pronounced effect on radial growth and induced abundant chlamydospore formation. However, *E. anomalous* incubated with galactose presented the same growth when compared to control without sugar, but induced emergent hyphae and poor chlamydospore formation while control produced only submerged (Figure 2) McDaniel and Hindal (13) reported that the growth of Mucoralean fungi is dependent on carbohydrate utilized as carbon source and also quality of nitrogen source. Clausz (6) observed that in *Achlya flagellata* C:N ratio affects the mycelial growth and that different sugars present a promotive effect and glucose at 0.125% presented 10 times promotion compared to control without sugar.

The effect of different concentration of glucose on radial growth of *E. anomalous* is shown in Figure 3. The calculation of linear regression ($y = 59.66 - 17.98x$) revealed that the radial growth is fair, which shows a negative linear regression ($r = -0.97317$) over the glucose concentration range tested i.e., increasing the sugar concentration, proportionally decreases the radial growth. Light had no effect on growth using different concentrations of glucose, when compared to darkness. However, increasing the glucose concentration, increase in carotenoid-like substances and chlamydospore formation was observed, suggesting that carotenogenesis under light is related to chlamydospore formation. The oxygen tension possibly plays some role in chlamydospore induction (7). Müller & Col. (14) suggested that the oxygen tension induced to a chlamydospore formation in 92% of the isolates of *Candida albicans*. However, the incubation of *E. anomalous* under N₂ atmosphere did not effect growth and chlamydospore production.

Bakerspiegel (1) observed that some strains of *Candida albicans* produce

Figure 3 - Correlation between concentrations of glucose and radial growth of *E. anomalous*. Incubations were carried out at 25°C under continuous light. Similar results were found in darkness.



chlamydospore at a concentration of glucose 500 times the concentration known to inhibit chlamydospore production by other strains.

In *E. anomalous* the same fact is observed and the consequence of chlamydospore formation is a decrease in the growth rate of submerged vegetative hyphae while the emergent hyphae is enhanced.

The studies with *E. anomalous* defined that glucose as the carbon source and, in particular asparagine as the source of nitrogen are responsible for chlamydospore formation. The results showed that chlamydospore production in *E. anomalous* requires an exogenous carbon source, conclude that this formation is not simply a response to starvation. Hughes (11) defined chlamydospore secondly as spore produced on specialized branches and this having a specific function in the life (e.g. the azygospores of mucoralean). So, in *E. anomalous* the thallospore formation has a primary function of prennation.

Acknowledgements

The authors are grateful to Prof. S.L. Ranson, Dept^o of Plant Biology, The University of Newcastle upon Tyne, U.K., G.M.C.T. was supported by grants from CAPES (1952/80) and Universidade Federal de Pernambuco, and CNPq (Processo n° 301426/81).

References

1. Bakerspiegel, A. Chlamydospore production by new strains of *Candida albicans*. Can. J. Microbiol., 9:909-910, 1963.
2. Barreira, C.B. Formation and ultrastructural of *Mucor rouxii* arthrospores. J. Bacteriol., 155:886-895, 1983.
3. Bartnick-Garcia, S.; Nickerson, W.J. Induction of Yeast-Like development in *Mucor* by carbon dioxide. J. Bacteriol., 84:829-840, 1962.
4. Beakes, G.W.; Campos-Takaki, G.M.; Takaki, M. The effect of glucose concentration and light on thallospore ultrastructure in *Ellisomyces anomalous* (Thamnidiaeae, Mucorales). Can. J. Botany., 62:2677-2687, 1984.
5. Benny, G.L. & Benjamin, R.K. Observation on Thamnidiaeae (Mucorales). New taxa, new observations, and notes on selected species. Aliso, 8:301-351, 1978.
6. Clausz, J.C. Factor affecting mycelial growth lipid content and fatty-acid composition in *Achlya flagellata*. Mycologia, 71:293-304, 1979.
7. Griffiths, D.A. The origin, structure and function of chlamydospore in fungi. New Hedwigia, 25:503-547, 1974.
8. Harding, R.W.; Shropshire, Jr. W. Photocontrol of carotenoid biosynthesis. Ann. Rev. Plant. Physiol., 31:217-238.
9. Hashimoto, T.; Pollack, J.H.; Blumenthal, N.J. Carotenogenesis associated with arthrosporulation of *Trichophyton mentagrophytes*. J. Bacteriol., 136:1120-1126, 1978.
10. Hesselton, C.W.; Anderson, P. The genus *Thannidium* and a study of the formation of its zygospores. Amer. J. Bot., 43:696-703, 1956.
11. Huges, S.J. Conidiophore, conidia and classification. Can. J. Bot., 31:577-659, 1953.
12. Jayaram, M.; Presti, D. & Delbaiick, M. Light-induced carotene synthesis in *Phycomyces*. Exp. Mycol., 3:42-52, 1979.
13. McDaniel, L.L.; Hindal, D.F. Host range and effect of host nutrition on parasitism by *Piptocephalis lepidula*. Mycologia, 71:996-1004, 1979.
14. Müller, H.L.; Koeppe, K.; Sdiff, W. Formation of chlamydospore and its application for a rapid identification of *Candida albicans*. Zentbl. Bakt. Parasitkde, Abt. In 203:403-415, 1967.
15. Rau, W. Photoregulation of carotenoid biosynthesis in plants. Pure Appl. Chem., 47:237-243, 1976.
16. Robinson, P.M. Practical fungal physiology. John Wiley & Sons, Chichester, New York. Brisbane, Toronto. 1978.
17. Valadon, L.R.G.; Osman, M.; Mummery, R.S. Phytochrome mediated carotenoid synthesis in the fungus *Verticillium agaricinum*. Photochem. Photobiol., 29:605-607, 1979.

MANUTENÇÃO DE FUNGOS POR PROCESSO DE LIOFILIZAÇÃO APÓS PERÍODO PROLONGADO DE TEMPO - 34 ANOS

Hassib Ashcar
 Claudete Rodrigues Paula
 & Vera Regina Petrocini

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

Recebido para publicação em 10/03/87

Resumo

Foram examinadas 18 amostras de fungos procedentes da coleção de culturas da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo e mantidas por processo de liofilização durante 34 anos. Na técnica utilizada os fungos foram suspensos em leite desnatado. Dentre as leveduras estudadas, amostras de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae*, e dentre os bolores, amostras de *Penicillium chrysogenum* e *Sporothrix schenckii* permaneceram viáveis, conservando suas características morfológicas e fisiológicas. As culturas de *C. albicans*, *C. neoformans* e *S. schenckii* mantiveram sua patogenicidade, observada através de inoculações experimentais.

Summary

Maintenance of fungi by lyophylization (Observation after 34 years)

The examination of 18 fungal cultures which have been preserved for 34 years in a lyophylized state in the culture collections of the Mycology Section of the Adolfo Lutz Institute in São Paulo is reported. The preservation techniques involved the suspension of the fungi in dried milk. The yeast species studies *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Rhodotorula glutinis* and the two filamentous fungi, *Penicillium chrysogenum* and *Sporothrix schenckii* all retained their morphological and physiological characteristics. Moreover, the cultures of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Sporothrix schenckii* were found to have retained their pathogenicity, as demonstrated by experimental inoculation.

Diversos métodos para a conservação de fungos têm sido empregados, apresentando cada um deles, vantagens e desvantagens. Até o presente momento, não existe um método padrão utilizado para as várias espécies de fungos, sem ser ainda estabelecido o tempo máximo de viabilidade, (Kirsoff & Shell, J.J. Maintenance of Microorganisms, Academic Press, London, 1984; Onions, A.H.S. Preservation on fungi, Academic Press, London, 1971).

O método de liofilização tem sido utilizado na manutenção de culturas de bolores, como também de leveduras, obtendo-se, de modo geral, resultados satisfatórios para a conservação desses microrganismos por período de tempo que variou de três meses a 26 anos (Ashcar, H. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 29/30:81-4, 1969/1970; Ashcar, H. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 33:7-11, 1973; Atkin, L.; Moses, W. & Gray, P.P. J. Bact., 57:575-8, 1949; Fennell, D.I.; Raper, K.B. & Flickinger, M.H. Mycologia, 42:135-47,

1950). O presente trabalho relata a manutenção de várias culturas de fungos, após processo de liofilização por tempo prolongado (34 anos).

Foram examinadas 18 amostras de fungos originárias da coleção de cultura da Seção de Micologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo que há 34 anos haviam sido submetidas a processo de liofilização. A partir de cultivos em ágar Sabouraud dextrose foram feitas suspensões dos fungos, em leite desnatado em pó, ao qual se adicionou água destilada na proporção do leite comum. As suspensões foram distribuídas em pequenas ampolas de vidro (0,5ml em cada uma). Em seguida, as preparações foram rapidamente congeladas em mistura de neve carbônica e álcool etílico e secadas no aparelho de Flosdorf. Após a secagem a vácuo as ampolas foram fechadas e conservadas em refrigerador a 4°C. O conteúdo das ampolas foi transferido para tubos de ensaio contendo caldo Sabouraud dextrose, acrescido de 2% de extrato de levedura, os quais foram incubados a 25°C e 37°C, durante no máximo 30 dias. À medida que as suspensões apresentavam crescimento foram plaqueadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas nas mesmas temperaturas. As colônias foram isoladas em tubos de ensaio com o mesmo meio de cultura. O estudo das características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas das leveduras foi realizado segundo técnicas padronizadas (Lodder, J., *The yeasts. A taxonomic study*, Elsevier. North Holland, 1970; Kreger-van Rij, *The yeasts. A taxonomic study*, N.J.W. Elsevier. N. York, 1984). Os bolores foram identificados através de suas características macroscópicas e microscópicas (Von Arx, J.A., *The genera of fungi. Sporulating in pure culture*, J. Cramer. Vaduz, 1974). Para o estudo da patogenicidade das culturas de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* (*Saccharomyces blanchardii*) e *Sporothrix schenckii* foram feitas inoculações experimentais, respectivamente, em veia marginal da orelha de coelho, cérebro de camundongo e testículo de rato.

Das 18 culturas liofilizadas, 10 permaneceram viáveis (Tabela 1), apresentando caracteres morfológicos e fisiológicos compatíveis com as descrições padrões (McGinnis, M.R., *Laboratory handbook of medical mycology*, Academic Press, New York, 1980; Kreger-van Rij, N.J.W. *The yeasts. A taxonomic study*, Elsevier. N. York, 1984).

As culturas de *C. albicans*, *C. neoformans* e *S. schenckii* conservaram a sua patogenicidade, verificada através das inoculações experimentais.

Tabela 1 - Viabilidade de fungos após 34 anos de liofilização.

Símbolos: - = Não viáveis; + = Viáveis; * = Nomenclatura atualizada segundo Mc Ginnis, 1980; Kreger-van Rij. 1984.

Denominação original	Denominação atual	Culturas de fungos		Viabilidade
<i>Zygosaccharomyces pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>			-
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>	<i>Zygosaccharomyces bailii</i>			-
<i>Saccharomyces chodatii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			-
<i>Saccharomyces vinimuntz</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			+
<i>Saccharomyces blanchardii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>			+
<i>Saccharomyces inusitatus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>			+
<i>Hansenula belgica</i>	<i>Pichia membranefaciens</i>			-
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>			+
<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>			+
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>			-
<i>Candida krusei</i>	<i>Candida krusei</i>			-
<i>Rhodotorula glutinis</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>			+
<i>Rhodotorula minuta</i>	<i>Rhodotorula minuta</i>			-
<i>Penicillium chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>			+
<i>Microsporum canis</i>	<i>Microsporum canis</i>			-
<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>			+
<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>			+
<i>Sporothrix schenckii</i>	<i>Sporothrix schenckii</i>			+

Comparando-se os tempos de viabilidade de fungos liofilizados e observados por alguns autores (Ashcar, H. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 29/30:81-4, 1969/1970; Ashcar, H. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 33:7-11, 1973) o tempo observado neste estudo (34 anos) é um dos mais prolongados.

Este processo de liofilização mostrou-se prático, eficiente e econômico para a manutenção de algumas espécies de fungos. Além disso, todas as características morfológicas, fisiológicas e a patogenicidade foram conservadas integralmente, evitando-se o pleomorfismo habitual de certas culturas fúngicas. Este método de preservação de culturas pode ser indicado tanto para algumas espécies de interesse médico como industrial.

DESCOLORAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO EFLUENTE DE UMA INDÚSTRIA DE CELULOSE BRANQUEADA*

Marcio R. Lambais

Recebido para publicação em 11/02/88

Deptº de Solos, Geologia e Fertilizantes ESALQ

Caixa Postal 9

13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Determinou-se o efeito do valor de pH inicial do efluente de uma indústria de celulose branqueada sobre a produção de biomassa, biodescoloração e redução da DQO por três espécies de fungos causadores de podridão-branca (*Polyporus* sp, *Coriolus* sp e *Polyporus sanguineus*). De uma maneira geral, as eficiências da biodescoloração e da redução da DQO foram muito elevadas, atingindo valores de até 85 e 80%, respectivamente. O pH ótimo para a biodescoloração do efluente foi inferior ao ótimo para produção de biomassa. *Polyporus* sp foi a espécie que apresentou a maior taxa de crescimento, além de uma grande eficiência de descoloração.

Summary

Biodecolorization of the effluent of a bleached pulp plant

The effect of the initial pH of a bleached pulp plant effluent on biomass production, biodecolorization and COD reduction for three white-rot fungus species (*Polyporus* sp, *Coriolus* sp and *Polyporus sanguineus*) was evaluated. In general, the efficiency of biodecolorization and COD reduction was very high, sometimes up to 85 and 80%, respectively. The optimun pH for effluent biodecolorization was lower than the optimun pH for biomass production. *Polyporus* sp was the species that showed the greatest growth rate, besides a great efficiency for biodecolorization.

Introdução

Um dos grandes problemas para a disposição dos efluentes hídricos das indústrias de celulose branqueada é a sua coloração, além de sua elevada carga orgânica. A carga orgânica, caracterizada por uma elevada demanda bioquímica de oxigênio (DBO), pode ser facilmente reduzida pelos processos microbiológicos convencionais de tratamento de efluentes, no entanto a cor não sofre alterações significativas.

Isto pode ser explicado pelo fato da cor do efluente ser causada principalmente por fragmentos poliméricos coloidais, clorados e altamente oxidados de lignina oriundos do processo de branqueamento da celulose (12), que não são degradados pelas bactérias que crescem normalmente nesses sistemas.

Porém, fungos causadores de podridão-branca, apodrecedores de madeira, possuem sistemas lignolíticos que podem degradar tanto as ligninas naturais (8) quanto as ligninas altamente modificadas, como a lignina kraft e as cloroligninas (7).

* Trabalho realizado na RIPASA S.A. - Celulose e Papel (Limeira), durante o ano de 1985.

Desta maneira, a utilização desses fungos, sob condições culturais controladas, para o tratamento dos efluentes de indústrias de celulose branqueada é altamente promissora em relação aos tratamentos físicos e químicos convencionais, reduzindo tanto a carga orgânica quanto a cor (9, 6, 3).

Várias espécies de fungos já foram testadas visando a descoloração desses tipos de efluente, dentre elas *Polyporus versicolor*, *Pleurotus sapidus*, *Phobia brevispora*, *Phobia subseralis*, *Lentinus edodes* e *Phanerochaete chrysosporium* (4, 11). A eficiência das diferentes espécies é bastante variável, destacando-se *Phanerochaete chrysosporium* como a mais eficiente.

O presente trabalho visa estudar o efeito do pH inicial do efluente na produção de biomassa e na eficiência de descoloração por espécies de fungos causadores de prodridão-branca.

Material e Métodos

As amostras do efluente utilizadas, após passagem por um sistema de tratamento biológico (lagoa aerada), possuíam em média uma demanda bioquímica de oxigênio (DBO) de 125mg de $O_2 \cdot l^{-1}$, uma demanda química de oxigênio (DQO) de 315mg de $O_2 \cdot l^{-1}$, pH 6,60 e 1350ppm de Pt de coloração.

O efluente utilizado para os ensaios foi suplementado com 14,7mM de P, na forma de KH_2PO_4 , 3,74mM de N, na forma de NH_4NO_3 e 1% de glicose. Os valores de pH foram corrigidos para 3,50, 4,00, 4,50, 5,00, 5,50, 6,00, 6,50 e 7,00 com NaOH ou HCl. Volumes de 50ml de efluente suplementado por parcela foram distribuídos em frascos erlenmeyer de 125ml e autoclavados a 120°C por 15 minutos. Em seguida, subamostras de cada parcela foram filtradas em membranas de 0,45 μm de porosidade para determinação da cor por espectrofotometria a 465nm, após correção do pH para 7,6, comparando-se com padrões de cloroplatinato.

O inóculo consistiu de 50mm² de micélio retirado da periferia de colônias com 15 dias, crescendo em meio agarizado de efluente suplementado com N, P e glicose. Foram utilizadas três espécies de fungos causadores de prodridão-branca (*Polyporus sp*, *Coriolus sp* e *Polyporus sanguineus*), isolados de matas do Estado de São Paulo.

Após incubação por 9 dias a 30°C, sem agitação (10), as amostras foram filtradas para determinação da quantidade de biomassa produzida (2), do pH, da cor e da DQO final. A DQO foi determinada segundo metodologia da APHA (1), juntando-se volumes iguais das 4 repetições dos tratamentos, determinando-se assim a DQO por tratamento, antes e após a incubação.

Foram mantidos controles não inoculados para se verificar a possível ocorrência de auto-oxidação das cloroligninas e consequente redução da cor.

Resultados e Discussão

As três espécies fúngicas mostraram comportamentos diferentes, quanto a produção de biomassa e a descoloração do efluente, em diferentes valores de pH (Figuras 1 e 2). *Polyporus sp* e *Coriolus sp* apresentaram máxima produção de biomassa no efluente com pH inicial 6,0, enquanto que para *P. sanguineus*, esse valor foi ligeiramente superior, ficando entre 6,5 e 7,0 (Figura 1). No geral, a produção de biomassa por *Polyporus sp* foi significativamente superior, em relação as outras duas espécies, principalmente em valores de pH maiores do que 5,0. *P. sanguineus* produziu as menores quantidades de biomassa, devido provavelmente à sua baixa taxa de crescimento micelial, que em efluente suplementado e agarizado foi aproximadamente 2 vezes menor do que a de *Polyporus sp*, a 30°C e pH 6,0 (Lambais, 1985, dados não publicados).

A descoloração do efluente foi máxima em valores de pH inferiores aos valores ótimos para crescimento micelial (Figura 2). A descoloração máxima por *Polyporus sp* ocorreu entre pH 4,5 e 5,0, diminuindo sensivelmente em valores extremos, principalmente em pH 7,0. *Coriolus sp* apresentou uma alta eficiência de descoloração numa faixa mais ampla de pH; com o aumento do pH, houve uma diminuição dessa eficiência, permanecendo no entanto superior as outras duas espécies, mesmo

em pH 7,0, o que pode ser muito interessante do ponto de vista industrial. *P. sanguineus* praticamente não apresentou diferenças significativas na redução de cor em valores de pH menores do que 5,0; acima de pH 5,0 essa espécie não foi capaz de descolorir o efluente, não diferindo significativamente do controle não inoculado.

Em ensaios com *P. chrysosporium* também foi observado que o pH ótimo para crescimento é ligeiramente superior ao pH ótimo para degradação da lignina em meios de cultura, estando o primeiro em torno de 4,5 - 5,5 e o segundo entre 4,0 - 4,5 (10), já em efluente da extração alcalina, o ótimo para crescimento estava entre 4,3 e 4,8 e para descoloração entre 4,0 e 4,5 (5).

A descoloração fúngica envolve a degradação dos fragmentos poliméricos de lignina a produtos solúveis ou voláteis, e/ou a destruição dos cromóforos nos polímeros (12). A degradação microbiológica desses polímeros é bastante significativa, pois em experimentos com *P. chrysosporium*, aproximadamente 50% das cloroligninas marcadas com ^{14}C , contidas no efluente da extração alcalina, foram convertidas a CO_2 (6). Sendo um processo enzimático, a biodescoloração é dependente do potencial genético dos microrganismos envolvidos para a produção das enzimas lignolíticas, potencial esse que pode apresentar grande variabilidade interespecífica. Nas condições deste experimento, *Coriolus sp* provavelmente produziu uma maior quantidade de enzimas lignolíticas por unidade de biomassa produzida, já que mostrou uma alta eficiência de descoloração, produzindo pequenas quantidades de biomassa, em relação a *Polyporus sp* principalmente.

De maneira geral, a descoloração por *Polyporus sp* e *Coriolus sp* tendeu a aumentar com o aumento da biomassa produzida. No caso de *P. sanguineus* o comportamento foi oposto, possivelmente pelo fato dessa espécie produzir um pigmento vermelho que pode ter se difundido para o meio.

As amostras sem inoculação não apresentaram uma redução significativa da cor, demonstrando que a auto-oxidação das cloroligninas não é de grande importância no processo de descoloração como um todo (Figura 2).

Polyporus sp e *Coriolus sp* além de serem muito eficientes na descoloração do efluente foram também muito eficientes na redução da DQO, atingindo valores de até 80% de redução em relação ao valor inicial (Figura 3). Isto poderia favorecer sua

Figura 1 - Produção de biomassa por diferentes fungos causadores de podridão-branca em efluente de uma indústria de celulose branqueada a diferentes valores de pH inicial.

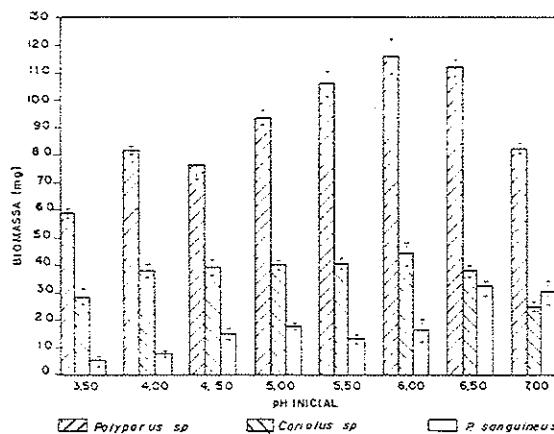
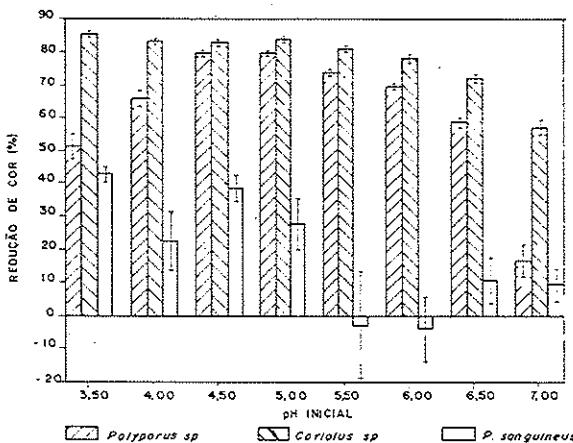


Figura 2 - Redução da cor do efluente de uma indústria de celulose branqueada com diferentes valores de pH inicial por diferentes fungos causadores de podridão-branca.



Polyporus sp principalmente.

Figura 3 - Redução da DQO do efluente de uma indústria de celulose branqueada por diferentes fungos causadores de podridão-branca a diferentes valores de pH inicial.

aplicação num processo biotecnológico para diminuir dois dos principais problemas para a disposição dos efluentes hídricos das indústrias de celulose branqueada, sua carga orgânica e cor elevadas.

O crescimento desses fungos no efluente resultou na produção de metabólitos extremamente ácidos, fazendo com que o pH final atingisse valores muito baixos, independente do valor inicial (Tabela 1).

A obtenção de novos isolados em locais mais favoráveis à atividade lignolítica e a otimização das condições culturais são aspectos a serem considerados para a maximização do processo de biodescoloração, já que a variabilidade genética desses fungos é muito grande e muito pouco foi explorado até agora.

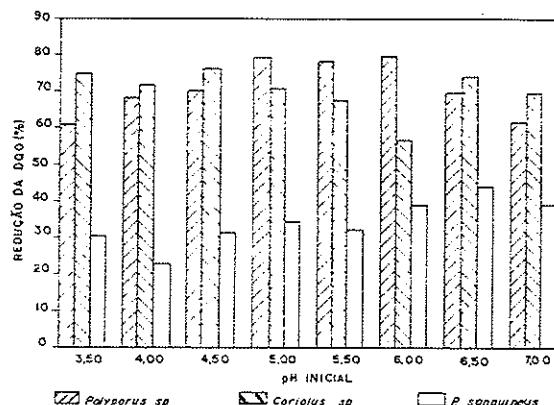


Tabela 1 - Acidificação do efluente por diferentes fungos causadores de podridão-branca.

pH Inicial	pH Final			
	Polyporus sp	Coriolus sp	P. sanguineus	Controle
3,50	3,16	2,66	5,13	3,45
4,00	3,02	2,68	2,99	4,01
4,50	2,84	2,74	3,05	4,35
5,00	2,86	2,82	3,08	4,90
5,50	2,92	2,86	3,20	5,40
6,00	3,29	3,13	3,26	5,48
6,50	4,33	4,29	3,81	6,43
7,00	4,45	4,80	4,51	6,97

Agradecimentos

O autor agradece a Ripasa S.A. - Celulose e Papel por ter possibilitado a realização deste trabalho.

Referências Bibliográficas

1. American Public Health Association/APHA - Standard methods for examination of water and wastewater. 14ed. New York, 1975.
2. Association of Official and Agricultural Chemistry/AOAC - Official methods of analysis. 13ed. Washington, 1980.
3. Campbell, A.G.; Gerrard, E.D.; Joyce, T.W.; Chang, H-m. & Kirk, T.K. The MyCor process for color removal from bleach plant effluent: bench scale studies. Tappi, Research and Development Division Conference, Proceedings: 209-214, 1982.
4. Eaton, D.C.; Chang, H-m.; Joyce, T.W.; Jeffries, T.W. & Kirk, T.K. Method obtains fungal reduction of the color of extraction stage kraft bleach effluents. Tappi, 65:89-92, 1982.
5. Eaton, D.C.; Chang, H-m. & Kirk, T.K. Fungal decolorization of kraft bleach plant effluents. Tappi, 63:103-106, 1980.
6. Eriksson, K.E. Swedish developments in biotechnology related to the pulp and paper industry. Tappi, 68:46-55, 1985.
7. Huynh, V.B.; Chang, H-m.; Joyce, T.W. & Kirk, T.K. Dechlorination of chloro-organics by a white-rot fungus. Tappi, 68:98-102, 1985.
8. Kirk, T.K. & Chang, H-m. Decomposition of lignin by white-rot fungi. I. Isolation of heavily degraded lignins from decayed spruce. Holzforschung, 28:217-222, 1974.

9. Kirk, T.K. & Chang, H-m. Potential application of biolignolitic systems. *Enz. Microb. Technol.*, 3:189-196, 1981.
10. Kirk, T.K.; Schultz, E.; Connors, W.J.; Lorenz, L.F. & Zeikus, J.G. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.*, 117:277-285, 1978.
11. Marton, J.; Stern, A.M. & Marton, T. Decolorization of kraft black liquor with *Polyporus versicolor*, a white-rot fungus. *Tappi*, 52:1975-1981, 1969.
12. Sundman, G.; Kirk, T.K. & Chang, H-m. Fungal decolorization of kraft bleach plant effluent - Fate of the chromophoric material. *Tappi*, 64:145-148, 1981.

ESTUDO PRELIMINAR DO EFEITO DA ADIÇÃO DE ETANOL NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA DESENVOLVIDA POR *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* F1*

Selma Gomes Ferreira Leite
 & Francisca Pessoa de França

Recebido para publicação em 07/03/88

Deptº de Engenharia Bioquímica - Escola de Química
 Bloco E - Centro de Tecnologia
 Cidade Universitária - Ilha do Fundão - UFRJ
 21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Saccharomyces cerevisiae F1 cultivada em meio contendo 150g/l de sacarose e teores variáveis de etanol (0 a 100g/l) apresentou diminuição da biomassa e do álcool produzidos e aumento do teor de açúcar residual com a crescente concentração de álcool adicionado. As células foram permeáveis ao etanol e não foi detectado acúmulo intracelular.

Summary

The process developed by *Saccharomyces cerevisiae* F1 were carried out in 150g/l of sucrose with variable ethanol concentration (0 to 100g/l). Biomass and ethanol produced were decreasing with the increasing of alcohol added while residual substrate was decreasing. Cells were freely permeable to ethanol and was not detected accumulated intracellular ethanol.

Várias influências são observadas por ação do teor alcoólico em microrganismos (Troyer, J.R. - Micología, 45:20-39, 1953; Novak, M. & Cols. Biotech. Bioeng., 23:201-211, 1981; Rodney, P.J. & Greenfield, P.F. Biotech. Letters, 6:471-476, 1984; Ingram, L. O'Neal & Butke, J.M. Advances in Microbiol. Physiol., 25:253-300, 1984).

Foram empregadas células de *Saccharomyces cerevisiae* F1, isoladas de fermento Fleischman, cultivadas em K₂HPO₄ 1,0g, (NH₄)₂ SO₄, 1,0g, MgSO₄ 7H₂O 0,5g, extrato de levedo 1,0g e açúcar cristal 30,0g por litro de meio em pH 5,5 a 30°C.

Após 24 horas de crescimento, 0,02g dessas células serviram de inóculo para 50ml de meio de fermentação, que foi o mesmo do cultivo, exceto o teor de açúcar que foi de 150g/l, com adição ainda de etanol em concentrações variáveis - 0 a 100g/l.

Nesses experimentos realizados a 30°C/72hs., foram quantificados a concentração celular por absorbância a 400nm relacionada com o peso seco, o substrato após hidrólise ácida pelo método da glicose-oxidase e o etanol por cromatografia gasosa, segundo Goel, S.C. & Pamment, N.B. (Biotech. Letters, 6:117-182, 1984). O etanol intracelular foi obtido através da equação inicialmente proposta por Novak, M. & Cols. (Biotech., Bioeng., 23:201-211, 1981) e o volume celular medido pela técnica de Borzani, W. & Vairo, L.R. Marina (Biotech. Letters, 5:247-252, 1983).

Observou-se que quanto maior o teor de etanol inicial menor foi o crescimento celular e maior o teor de açúcar residual; o álcool parece ter afetado diretamente esses parâmetros. A ação foi muito significativa na concentração inicial de 85g/l de etanol, quando não houve aumento da biomassa e o substrato não foi consumido. A diminuição do consumo de substrato foi colaborado por Gray, W.D. (J. Bacteriol., 52:703-709, 1946). A diminuição nas eficiências de fermentação demonstra o efeito sobre o metabolismo microbiano. Pode-se notar também uma difusão do etanol através

* Trabalho realizado com auxílio do CNPq.

da membrana celular, pois quando se adicionou 39,75g/l de álcool, houve produção de apenas 37,76g/l e o teor de etanol intracellular foi de 70,09g/l.

Guijarro, J.M. & Lagunas, R. (J. Bacteriol., 160:874-878, 1984) demonstram a livre permeação do etanol por simples difusão através da membrana celular. Provavelmente essa difusão se deu nas primeiras horas do processo determinando assim a ação marcante do álcool; nas concentrações crescentes, sem dúvida, o efeito prejudicial foi também crescente.

Não foi detectado acúmulo de etanol intracelular, conforme referências de Guijarro, J.M. & Lagunas, R. (J. Bacteriol., 160:874-878, 1984), Goel, S.C. & Pamment, N.B. (Biotech. Letters, 6:177-182, 1984), Dasari, G. & Cois. (Biotech. Letters, 7:541-546, 1985) e Dombeck, K.M. & Ingram, L.O. (Applied and Env. Microbiol., 51:197-200, 1986).

Tabela 1 - Dados obtidos em função do etanol adicionado na fermentação por *Saccharomyces cerevisiae* F1.

Símbolos: (*) = Desvio padrão da média; S/C = Sem crescimento; Açúcar inicial = 150,00 ± 4,04g/l; Células iniciais = 0,40 ± 0,07g/l.

Determinações	0	13,30±0,11	39,75±0,49	85,00±0,36	105,94±1,82
Açúcar residual (g/l)	8,22±0,27(*)	27,58±3,00	67,58±2,48	149,27±3,36	151,00±1,60
Células (g/l)	2,84±0,14	2,41±0,28	1,58±0,12	0,38±0,01	0,34±0,02
Etanol total (g/l)	68,76±2,98	62,40±1,07	57,51±3,92	85,35±2,52	100,17±5,05
Etanol produzido (g/l)	68,76	45,10	17,76	-	-
Etanol interno (g/l)	61,12±3,37	58,09±4,92	70,09±4,40	S/C	S/C
Eficiência de fermentação	97,12%	65,43%	40,05%		

SURTO DE SAPROLEGNIOSA EM GIRINOS (*RANA CATESBEIANA*)

José Luiz Catão Dias
 Selene Dall'Acqua Coutinho
 Elizabeth Oliveira da Costa
 Vania Maria de Carvalho
 Eliana Reiko Matushima
 Idérico Luiz Sinhorini
 & Maria Christina Gaviolle

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
 Av. Corifeu de Azevedo Marques, 2720
 05340 São Paulo SP

Recebido para publicação em 25/03/88

Resumo

Relata-se a ocorrência de saprolegniose em trinta e dois (32) girinos de *Rana catesbeiana* mantidos em aquário de vidro (oito animais por litro de água desclorada, constantemente aerada e à temperatura ambiente). Os animais foram tratados cirurgicamente para o estudo da resposta inflamatória, isto é, transfixação do tecido muscular da cauda. Três dias após, os girinos apresentaram mudanças comportamentais, despigmentação generalizada e o desenvolvimento de tufo cotonosos (1,0mm de diâmetro) em ambos os lados da cauda. Em 24 horas a mortalidade atingiu 100%. Os resultados obtidos através de exames histopatológico e microbiológico confirmaram a presença de um fungo, identificado como *Saprolegnia* sp.

Summary

*Saprolegniosis outbreak in tadpoles (*Rana catesbeiana*)*

An outbreak of saprolegniosis was observed in thirty-two (32) tadpoles kept in a glass aquarium (eight animal per litre of de-chlorinated water under constant aeration and environmental temperature). These animals haved been treated for the surgically for the study of inflammatory response, i.e., transfixion of the tail's muscular tissue. Three days after surgery the animals showed behavior changes, general depigmentation and développement of cotton like bunches (1,0mm diameter) at both sides of the tails; on the following day the death ratio reached 100%. The histological and microbiological examination of the collected material revealed the presence of a mould that was identified as *Saprolegnia* sp.

Introdução

Dentre as formas alternativas de produção de proteína animal, a ranicultura é uma das mais promissoras (3). Apesar do crescente interesse despertado por esta atividade, faltam subsídios que possibilitem a instalação de tecnologia capaz de obter índices mais elevados de produtividade. Muito vem sendo feito quanto aos aspectos zootécnicos da criação de Rã Touro Gigante (*Rana catesbeiana*) no Brasil (2, 6, 11). Por outro lado, pouco se conhece sobre aspectos que envolvem a sanidade

desses animais, como microbiota normal e patogênica, epidemiologia, patologia e controle das infecções. O presente trabalho visa relatar o isolamento de *Saprolegnia* sp, como responsável por alta mortalidade observada em girinos (*Rana catesbeiana*).

A saprolegnose é uma dermatose causada por fungos do gênero *Saprolegnia*. Macroscopicamente caracteriza-se pela presença de tufos brancos cotonosos, que se projetam acima da pele dos animais, podendo produzir ulcerações dérmicas superficiais e profundas (4, 8, 13, 14, 18), algumas vezes comprometendo também o esqueleto (4, 13). As descrições histopatológicas referem lesões do tipo degenerativo e necrótico, acompanhadas de um quadro inflamatório agudo caracterizado por edema e celularidade aumentada (4, 14).

Acomete animais de água doce, sendo que em peixes teleósteos a infecção tem sido frequentemente relatada (4, 8, 14). Tiffney (19), 1939, sugere a associação entre a saprolegnose e injúrias inespecíficas, incriminando as espécies *S. ferax* e *S. parasitica* como os agentes causais. Recentes estudos experimentais em peixes confirmaram que a infecção natural ocorre primariamente por abrasão superficial (16).

Em outras espécies animais, como o camarão de água-doce (*Macrobrachium acanthurus*), esta infecção fúngica vem despertando crescente interesse, por seu surgimento estar diretamente relacionado a condições insatisfatórias de criação como superpopulação, deficiências nutricionais, temperatura inadequada e manipulação traumática (9).

Em anfíbios esta dermatomicoses é pouco referida, tendo sido feita a primeira descrição em girinos em 1887 (13). Mok & Morato de Carvalho (12), 1985, em levantamento de fungos patogênicos realizado em 450 anuros capturados na Região Amazônica, não isolaram *Saprolegnia* sp a partir de órgãos internos (fígado, pulmão, rim, baço, coração e gônadas).

Material e Métodos

Trinta e dois girinos (estádio 25) (7) de *Rana catesbeiana* foram tratados cirurgicamente para o estudo da resposta inflamatória. O procedimento experimental consistiu na transfixação do tecido muscular da cauda após anestesia dos animais com solução aquosa de benzocaina (1:10000) (5). Os materiais utilizados foram agulha reta atraumática nº 12 e fio trançado de algodão número 4-0 estéreis. A seguir, os espécimes foram acondicionados em aquário de vidro, 8 girinos por litro de água descolorada, mantidos sob aeração constante e temperatura ambiente (T_9 média $22^{\circ}\text{C} \pm 1$). A limpeza do aquário e filtros era realizada diariamente com a troca completa da água e posterior alimentação com ração, fragmentada em partículas de 0,42mm de diâmetro¹. Nenhuma substância antisséptica foi utilizada na água durante o experimento.

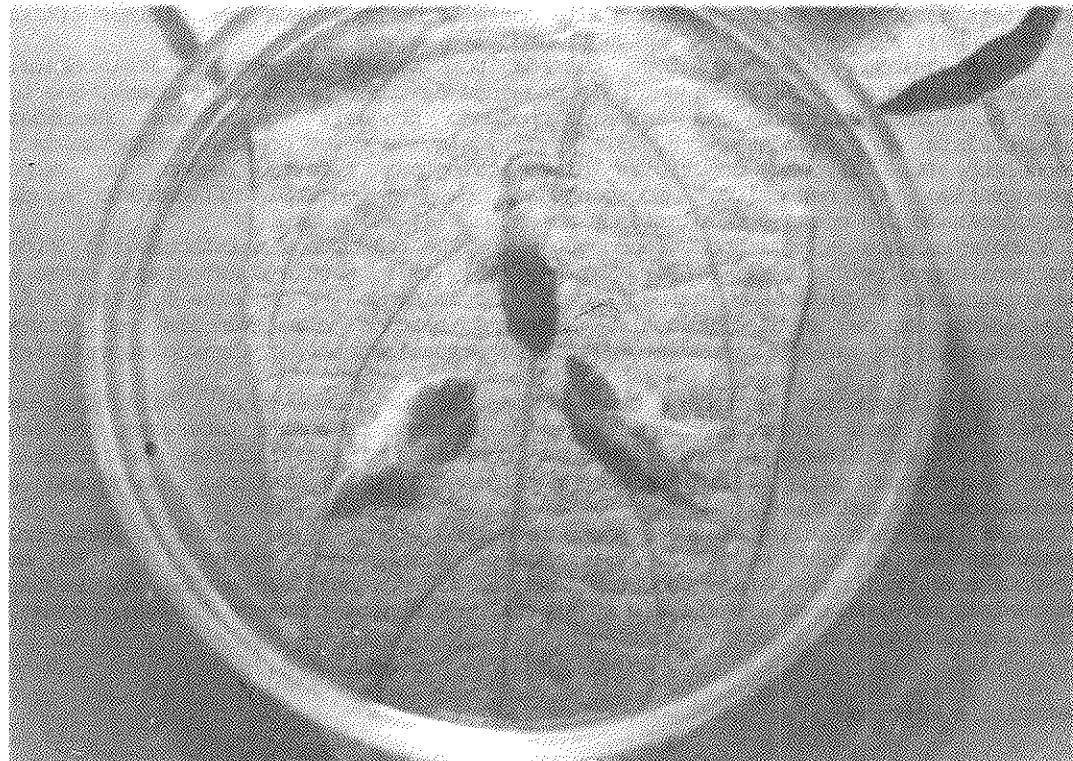
Os materiais encaminhados para exame histopatológico e microbiológico foram colhidos de quatro animais sacrificados quando do surgimento das lesões. Para os cortes histológicos, os fragmentos de cauda foram fixados em formol 10% isotônico e neutro, incluídos em parafina e corados pelas técnicas de Hematoxilina-Eosina, PAS, impregnação com prata. Para os exames microbiológicos, material semelhante foi colhido e cultivado em ágar BHI², ágar Sabouraud dextrose² com cloranfenicol (100mg/ml) à temperatura ambiente e a 37°C .

1. Purina
2. Difco

Resultados

As primeiras lesões perceptíveis surgiu ao término do 3º dia, acometendo a totalidade dos animais utilizados no experimento. As alterações consistiam em lesões puntiformes, esbranquiçadas, localizadas em ambos os lados da cauda, junto à

Figura 1 - Tufos cotonosos junto à base do fio de sutura na cauda dos girinos.



base do fio, com aproximadamente 0,5-1,0mm de diâmetro, despigmentação generalizada e modificações comportamentais por parada no consumo de alimentos e permanência dos animais em grupos nos cantos do aquário, sem reagir à manipulação.

No quarto dia, com a evolução, observaram-se tufos cotonosos esbranquiçados, de aproximadamente 1,0cm de diâmetro, extremamente delicados que se desfaziam ao toque, ocorrendo neste dia alta mortalidade, que posteriormente atingiu 100% (Figura 1).

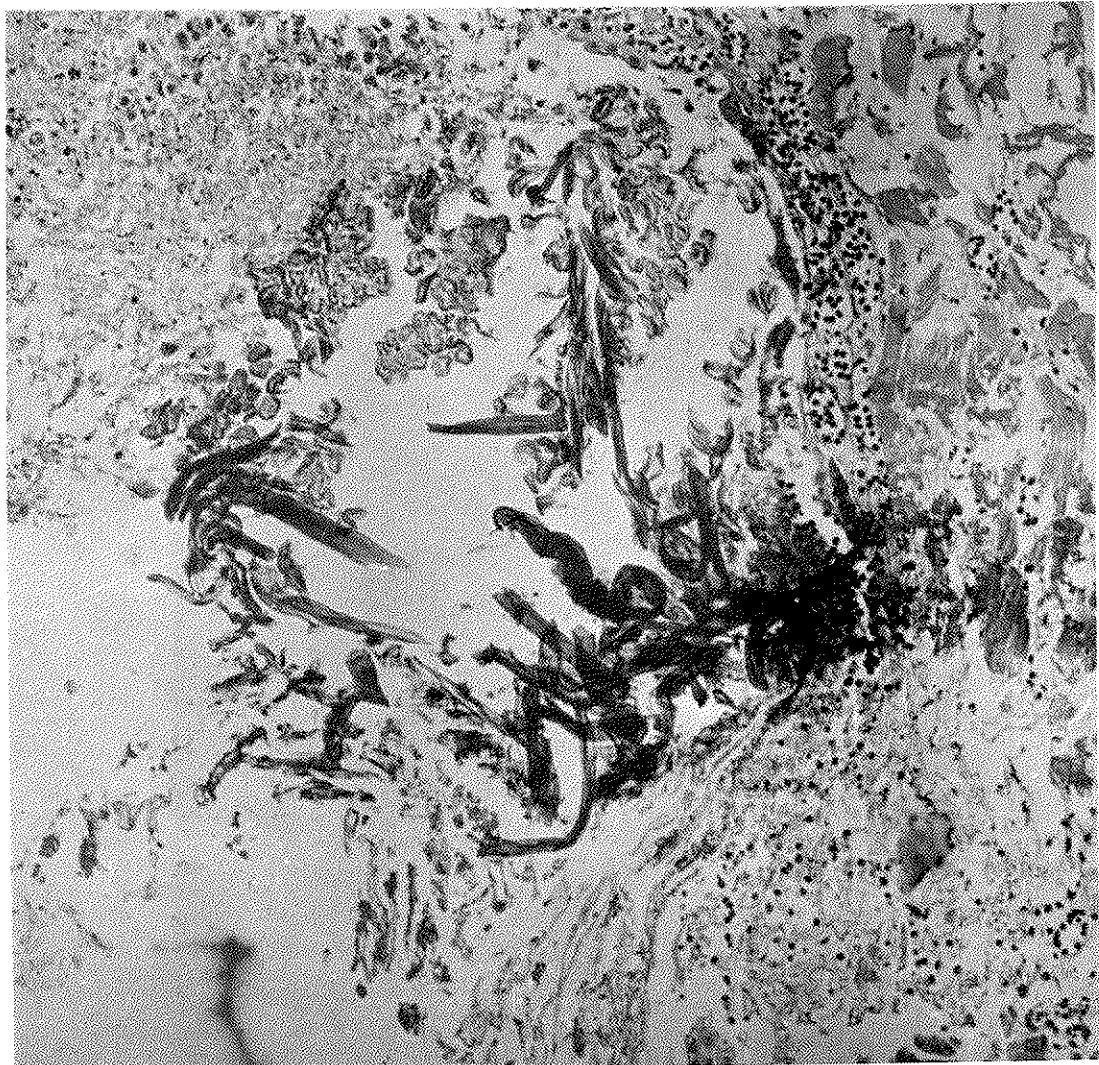
O exame histopatológico demonstrou intensa necrose das fibras musculares, severo edema intersticial evidenciado pelo esgarçamento dos tecidos adjacentes ao foco necrótico, presença de células polimorfo e mononucleares estranhas ao tecido e células do microrganismo (Figura 2).

Quanto ao exame microbiológico, após 10 dias de incubação observou-se em ágar Sabouraud com cloranfenicol a 37°C e à temperatura ambiente, colônia de cor creme com micélio aéreo cotonoso, de crescimento exuberante. Através do exame microscópico, corando-se o fungo pelo azul de lactofenol algodão, foram visualizadas hifas cenocíticas e esporângios terminais cilíndricos, pouco mais largos que as hifas, contendo em seu interior zoósporos arredondados ou piriformes de parede espessa e espiculada (Figura 3), características do gênero *Saprolegnia* (1, 17), fungo pertencente à ordem Saprolegniales da subdivisão Mastigomycotina (15).

Discussão

Embora a saprolegnose, uma vez instalada, represente sério risco para a criação podendo ocasionar alta mortalidade (8, 13, 16), na ausência de fatores predisponentes como os já citados, todos os autores consultados (4, 8, 14) que relatam o *Saprolegnia* sp como patógeno, são unânimes em afirmar que os próprios

Figura 2 - Corte histológico corado pelo HE, onde se observa necrose das fibras musculares, edema intersticial, presença de infiltrado celular inflamatório e estruturas do microrganismo (aumento 80X).

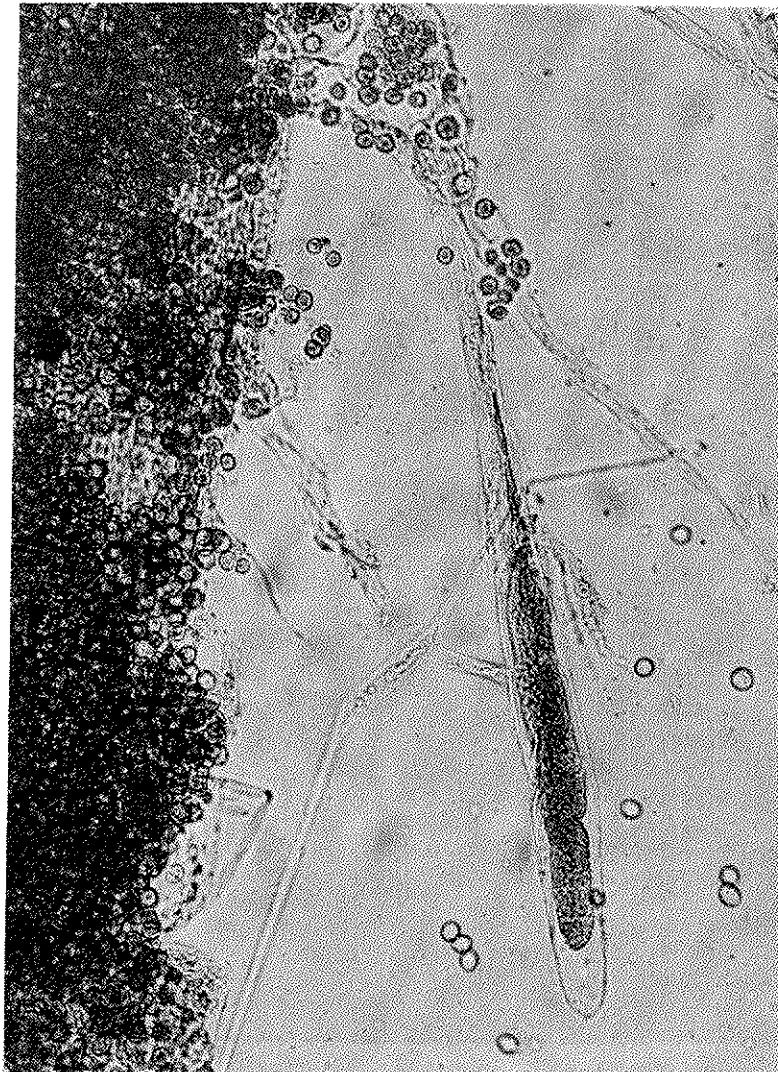


animais apresentam alta capacidade de controlar a infecção.

Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com aqueles da literatura (13, 19), em que esta afecção em anfíbios apresenta aspectos quanto à epidemiologia, patogenia e anatomia patológica muito semelhantes àqueles observados em outros animais de água-doce, principalmente nos peixes teleósteos, nos quais assume particular importância (4, 8, 16).

Estando a ranicultura brasileira em franco desenvolvimento, considera-se face à alta mortalidade observada neste relato, aconselhável manter-se severa vigilância nos criatórios nacionais, a fim de se evitar quebras na produtividade decorrentes desta dermatomicose.

Figura 3 - Lâmina corada pelo azul de lactofenol-algodão, visualizando-se hifas cenóticas e esporângio terminal cilíndrico, contendo zoósporos arredondados de parede espessa. (aumento 500X).



Agradecimentos

Ao setor de Ranicultura do Instituto de Pesca de São Paulo, nas pessoas dos Doutores Dorival Fontanello, Luiz Antonio Penteado, Henrique Arruda Soares e José Mandelli Jr., pelo fornecimento dos animais.

Referências Bibliográficas

1. Alexopoulos, C.J. Introducción a la micología. 2.ed., Buenos Aires, Editorial Universitaria de Buenos Aires, 1976.
2. Arruda Soares, H.; Fontanello, D.; Mandelli, Jr. J.; Reis, J.M.; Penteado, L.A.; Campos, B.E.S. - Efeito da densidade de população no ganho de peso de girinos da Rã Touro (*Rana catesbeiana* Shaw, 1802). B. Inst. Pesca, 10:47-51, 1983.
3. Culley, Jr. D.D. Have we turned the corner on Bullfrog culture? Aquaculture magazine, 7(3):20-24, 1981.
4. Duijin, C. van Jr. Diseases of fishes. 2.ed., London, London Pliffe Books, 1967.
5. Ferreira, J.T.; Smith, G.L.; Scoondee, H.L.; Holzapfel, C.W. Comparision of anesthetic potency of benzocaine hydrochloride and MS-222 in two freshwater fish species. The Progressive fish Culturist, 41(3):161-163, 1979.
6. Fontanello, D.; Arruda Soares, H.; Silva Neto, B.C. - Avaliação e rendimento de carcaças de Rãs Touro, *Rana catesbeiana*, provenientes de Juquitiba e destinadas à comercialização. B. Inst. Pesca, 8:111-118, 1981.
7. Gosner, K.L. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. Herpetológica, 16:183-90, 1960.
8. Huet, M. - Tratado de Piscicultura. 3.ed., Madrid, Ediciones Mundi-Prensa, 1983.
9. Lobão, V.L. & Valenti, W.C. - Relação entre a temperatura ambiente e a incidência de infecções por bactéria quitinolítica e fungo em *Macrobrachium acanthurus* Wiegmann, 1836. B. Inst. Pesca, 10(único):29-33, 1983.
10. Mandelli, Jr. J.; Justo; C.L.; Penteado, L.A.; Fontanello, D. Arruda Soares, H.; Campos, B.E.S. - Influência do tamanho da partícula alimentar sobre o ganho de peso de girinos de *Rana catesbeiana* Shaw 1802, criadas intesivamente. B. Inst. Pesca, 12(2):61-66, 1985.
11. Mandelli, Jr. J.; Arruda Soares, H.; Fontanello, D.; Penteado, L.A.; Campos, B.E.S. Different sizes of net cages and the weight gains of bullfrog tadpoles. Rev. Fac. Med. Zootec. Univ. S. Paulo, 24(2):209-212, 1987.
12. Mobk, W.Y. & Morato de Carvalho, C. Association of anurans with pathogenic fungi. Mycopathologia, 92(1):37-43, 1985.
13. Reichenbach-Klinke, H. & Elkan, E. Diseases of amphibians. London, Academic Press Inc., 1965.
14. Roberts, R.J. Patología de los peces. Madri, Ediciones Mundi-Prensa, 1981.
15. Silveira, V.D. Micología. 4.ed., Rio de Janeiro, Ed. Interamericana, 1981.
16. Shinghal, R.N.; Jeet, S.; Davies, R.W. Experimental transmission of *Saprolegnia* and *Achlya* to fish. Aquaculture, 64:1-7, 1987.
17. Stevenson, G.B. - Biología dos fungos, bactérias e vírus. São Paulo, Editora Polígono S.A., 1974.
18. Thatcher, V.E. - Patología de peixes da Amazônia brasileira. 1. Aspectos gerais. Acta Amazonica, 11(1):125-40, 1981.
19. Tiffney, W.N. The identify on certain species of the saprolegnose parasitic in fish. J. Elisha Mitchell Sci. Soc., 55:134-51, 1939.

THE EVALUATION OF THE CELLULOLYTIC ACTIVITY IN SOME STRAINS OF
ASPERGILLUS NIGER GROUP

Gustavo Henrique Goldman

Recebido para publicação em 29/03/88

Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(FAPESP)

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de São Paulo
Caixa Postal 83
13400 Piracicaba SP

Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

Deptº de Biologia Geral
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina
Campus Universitário
86100 Londrina PR

& João Lúcio de Azevedo

Deptº de Genética
Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"
Universidade de São Paulo

Summary

A total of 28 wild type strains of *Aspergillus niger* were tested for cellulolytic activity comparatively with the strain *Trichoderma reesei* QM 9414. Twenty-one of them (71%) did not differ statistically from *T. reesei* QM 9414. Some strains of *A. niger* are non-toxic and their cellulases are used in the food industries. These results are important since the cellulases of *Trichoderma* spp are suspicious to be used in the food industries because they produce mycotoxins.

Resumo

Avaliação da atividade celulolítica de algumas linhagens do grupo Aspergillus niger

Foi ensaiada a atividade celulolítica de 28 linhagens do grupo *A. niger* em comparação com a linhagem industrial de *T. reesei* QM 9414. Vinte e uma linhagens não mostraram diferença estatística significativa de *T. reesei* QM 9414. Algumas linhagens de *A. niger* não são tóxicas e são usadas na indústria alimentícia. Os resultados obtidos são importantes levando-se em consideração que as celulases de *Trichoderma* spp não são recomendadas na indústria de alimentos, já que há produção de micotoxinas.

Introduction

Cellulase production has recently attracted great attention due to its potential importance in saccharification of cellulose to glucose. However, no significant

process utilizing cellulase has been launched to date because of the high cost of the enzyme (3). To make enzymatic hydrolysis more competitive, research leading to increased enzyme production by cellulolytic microflora has been emphasized (10). Thus, genetical improvement programs were developed to select hypercellulolytic microorganisms (12), mainly fungi belonging to the *Trichoderma* genus (4, 5, 11).

One of the most basic and simple methods of genetic breeding is the search for already existing natural variability. This method has been applied to cellulolytic microorganisms to isolate strains and species from different habitats (1, 4, 7, 8, 12). In tropical countries such as Brazil, a more rational screening of the microflora may reveal promising cellulolytic species. As the result of one study carried out in our country, a thermophilic strain of the genus *Humicola* was isolated which produced more β -glucosidase than *Trichoderma reesei* QM 9414. In another work, Goldman & Azevedo (7) have tested a total of 88 isolates of *Trichoderma* spp isolated from Brazilian soils. Twenty-one of them (23%) did not differ statistically from *T. reesei* QM 9414 (9).

Cellulase of *Aspergillus niger* represents a significant part in the commercial Japanese production of 45 ton per year (6). The black aspergilli are known to be good producers of β -glucosidase, while the production of this enzyme in *T. reesei* is relatively low (15). Sternberg & Cols. (15) showed that when *Trichoderma* cellulase preparations are supplemented with β -glucosidase from *Aspergillus* during practical saccharifications, glucose is the predominant product and the rate of saccharification is significantly increased. The stimulatory effect of β -glucosidase appears to be due to the removal of inhibitory levels of cellobiose (11), which inhibits the cellulase enzymes. Nybergh & Bailey (13) also showed this in the batch hydrolysis of cellulose by *T. reesei*: the addition of only very small amounts of *Aspergillus niger* β -glucosidase was sufficient to increase considerably the glucose yield.

In view of these considerations, the objective of this work was to compare the cellulolytic activity of a total of 28 wild type strains of *Aspergillus niger* group with that of *Trichoderma reesei* QM 9414. This investigation is part of a major program concerning cellulolytic fungi in tropical regions.

Materials and Methods

A total of 28 wild type strains of *Aspergillus niger* group stored in *Aspergillus* complete medium described by Pontecorvo & Cols. (14) pH 6,8 at 49 centigrades were assayed for cellulolytic activity. For this, conidia of each isolate were inoculated with a loop in 210 x 11mm tubes containing 15ml of Acid-Swollen Cellulose medium (ASC). The inoculation was made on the bottom of the medium. The composition of the medium is as follows (in g.l⁻¹): KCl, 3,8; K₂PO₄, 2,0; MgSO₄.7H₂O, 0,1; (NH)₄SO₄, 1,0; malt extract, 0,6; acid cellulose, 8,0; and agar 15,0, pH 7,0. Acid-Swollen Cellulose was obtained by acid hydrolysis of filter paper (16). *T. reesei* QM 9414 was used as a control. After inoculation, the tubes were maintained at 28 centigrades. Also another control tube without inoculum was maintained at the same temperature. The volume of cellulose degradation was estimated by measuring the clear zone in the tube at intervals of five days for a period of 15 days. Data were analysed statistically by the Tukey test. In the screening the design used was randomized blocks with subdivided plots.

Results and Discussion

Table 1 shows the cellulolytic activity expressed as volume of degradation. Analysis of variance was performed and demonstrated that the cellulolytic activity of 21 strains did not differ at the 5% level (Tukey test) from *T. reesei* QM 9414 (Table 1). The cellulolytic activity was higher during the first five days than during the other periods of time, with the difference being statistically significant at the 5% level (Tukey test).

Lutzen & Cols. (9) have tested cellulase from *Aspergillus* spp in comparison with

this enzyme in *T. reesei*. They concluded that the *Trichoderma* system is not unique and more effective enzyme complexes can be produced from different *Aspergillus* spp. Our results partially confirm this conclusion since 21 strains (71%) of *Aspergillus niger* group tested did not differ from *T. reesei* QM 9414. The latter strain is the product of genetical improvement program, while these 21 isolates are non-improved ones. Further genetical improvement of these isolates may potentiate the production of cellulolytic enzymes. Another interesting aspect is that *Aspergillus niger* has already been traditionally used by the industries for the production of enzymes, for example pectinases, glucoamylases, glucose oxidases, and including cellulases (2). Some strains of this species are approved by the Food and Drug Administration in the United States (FDA-USA) in order to accomplish this production; these strains are non toxic and are used by the food industries. This is important since the cellulases of *Trichoderma* spp are suspicious to be used in the food industries because they produce mycotoxins.

Acknowledgments

We are grateful to the following persons and/or Institutions: to J.S.C. Fernandes for help with the statistical analysis; to V. Warwar that kindly provided the strains of *A. niger*; to C. Costa for the suggestions; and to Secretaria de Tecnologia Industrial from Ministerio da Industria e Comercio (Brazil) by the financial aid.

Table 1 - Cellulolytic activity, expressed as volume (mm^3) of degradation in 28 species of the *Aspergillus niger* group.

Symbols: + = The results are the mean of four repetitions; ++ = Isolates followed by the signal * did not differ from *T. reesei* QM 9414 at the 5% level by the Tukey test. Analysis of variance was performed on data transformed to $\sqrt{x + 0.5}$.

Strains ++	Time (Days) +		
	5	10	15
<i>T. reesei</i> QM 9414 *	807,0	1283,0	1663,0
25.00 *	665,0	1093,0	1378,0
M *	665,0	1188,0	1473,0
337 *	713,0	1140,0	1425,0
22.00 *	713,0	1140,0	1473,0
19.00 *	760,0	1188,0	1568,0
7.00 *	713,0	1188,0	1521,0
14.00 *	665,0	1093,0	1425,0
12.00	618,0	998,0	1283,0
29.00 *	665,0	1093,0	1425,0
391.08	665,0	998,0	1283,0
30.00 *	713,0	1093,0	1425,0
11.00	523,0	855,0	1140,0
28.00 *	665,0	1045,0	1330,0
9.00 *	760,0	1186,0	1521,0
11.382	523,0	713,0	903,0
12.1066	523,0	760,0	950,0
35.00	618,0	950,0	1140,0
32.00 *	713,0	1140,0	1425,0
37.00	665,0	1093,0	1425,0
21.00	665,0	1140,0	1521,0
16 *	665,0	1093,0	1378,0
23.00 *	665,0	1093,0	1425,0
27.00 *	713,0	1140,0	1521,0
8.00 *	665,0	1045,0	1473,0
31.1.08	570,0	903,0	1188,0
31.00 *	713,0	1093,0	1378,0
26.00 *	665,0	1045,0	1378,0

References

1. Araujo, E.F.; Barros, E.G.; Caldas, R.A. & Silva, D.O. - β -glucosidase activity of a thermophilic cellulolytic fungi, *Humicola* sp. Biotechnol. Letters, 5:781-784, 1983.
2. Bail, C. - Filamentous Fungi. In: Genetics and Breeding of Industrial Microorganisms, Chapter 7, CRC Press, 203pp, 1984.
3. Fennington, G.; Lupo, D. & Stutzenberger, F. - Enhanced cellulase production in mutants of *Thermomonospora curvata*. Biotechnol. Bioeng., 24:2487-2497, 1982.
4. Ghosh, V.K.; Ghose, T.K. & Gopalkrishnan, K.S. - Improvement of *Trichoderma reesei* strain through mutation and selective screening techniques. Biotechnol. Bioeng., 24:241-243, 1982.
5. Ginterova, A.; Janotkova, O.; Zemek, J.; Augustin, J. & Kuniak, L. - Cellulase activity of higher fungi. Folia Microbiologica, 25:318-323, 1980.
6. Goksoyr, J. & Eriksen, J. - Cellulases. Microbial Enzymes and Bioconversions. Edited by A.H. Rose, Academic Press, Economic Microbiology, vol.5, 1980.
7. Goldman, G.H. & Azevedo, J.L. - A simple screening of the cellulolytic activity of *Trichoderma* spp isolates in comparison with *T. reesei* QM 9414. Arq. Biol. Tecnol., 30(2):267-273, 1987.

8. Gupta, J.K.; Simrkot, C.K. & Dhawan, S. - Isolation and mutation of cellulolytic fungi. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 28:31-36, 1981.
9. Lutzen, N.W.; Nielsen, M.H.; Oxenboell, K.M.; Schulein, M. & Stentebjerg-Olesen, B. - Cellulases and their application in the conversion of lignocellulose to fermentable sugars. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 300(1100):283-292, 1983.
10. Mandels, M. - Applications of cellulases. In: *Cellulases: Production, Properties and Applications*. Biochemical Society Transactions, 611 th Meeting, Galway, Edited by M.P. Coughlan, p.414-416, 1985.
11. Mishra, S.; Gopalkrishnan, S. & Ghose, T.K. - A constitutively cellulase-producing mutant of *Trichoderma reesei*. *Biotechnol. Bioeng.*, 24:241-243, 1982.
12. Nevalainen, K.M.H.; Palva, E.T. & Bailey, M.J. - A high cellulase producing mutant strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2:59-60, 1980.
13. Nybergh, P.M.A. & Bailey, M.J. - Utilization of β -glucosidase from *Aspergillus* species in the hydrolysis of cellulose. In: *Enzyme Engineering*, vol.5. Edited by H.H. Weetal & G.P. Royer, Plenum Press, 1980.
14. Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; MacDonald, K.D. & Bufton, A.W.J. - The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238, 1953.
15. Sternberg, D.; Vijayakumar, P. & Reese, E.T. - β -glucosidase: microbial production and effect on enzymatic Hydrolysis of Cellulose. *Can. J. Microb.*, 23:139-147, 1977.
16. Tansey, M.R. - Agar diffusion assay of cellulolytic ability of thermophilic fungi. *Arch fur Microbiol.*, 77:1-11, 1971.

"ENZIMAS HISTOLÍTICAS PRODUZIDAS POR LEVEDURAS DO GÊNERO CANDIDA"

Mario Tsunezi Shimizu

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

Recebido para publicação em 29/03/88

Resumo

Verificou-se a produção de hialuronidase, condroitin sulfatase, lecitinase e gelatinase, por amostras de leveduras do gênero *Candida*, isoladas da cavidade bucal. Todas as amostras de *C. albicans*, produziram hialuronidase e condroitin sulfatase, mas não lecitinase e gelatinase. Das 17 amostras de *C. parapsilosis* testadas, apenas 2 produziram lecitinase e 4 produziram gelatinase. Das 6 amostras de *C. krusei*, 4 produziram apenas gelatinase. *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, não produziram qualquer das enzimas estudadas.

Summary***Hystolytic enzymes produced by yeasts of genus Candida***

The purpose of the experiment was to verify the production of the enzyme hyaluronidase, chondroitin sulfatase, lecithinase and gelatinase, "in vitro", from strain of yeast of genus *Candida*, isolated from the saliva. All the strains of *C. albicans* tested produced hyaluronidase and chondroitin sulfatase, but not lecithinase and gelatinase. From the seventeen strains of *C. parapsilosis* tested, only 2 of them produced lecithinase and 4 gelatinase. Only 4 from six strains of *C. krusei*, produced gelatinase. *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* did not produce any of the enzymes searched.

Introdução

Diversas enzimas como a hialuronidase, condroitin sulfatase, lecitinase e gelatinase, são produzidas por bactérias. A hialuronidase e condroitin sulfatase são capazes de despolimerizar o ácido hialurônico e sulfato de condroitin, importantes constituintes da substância fundamental do tecido conjuntivo (5, 15, 31). A lecitinase é capaz de hidrolisar a lecitina das membranas celulares e causa a lise de células teciduais, eritrócitos e leucócitos (19), enquanto que a gelatinase revela a atividade proteolítica de determinados microrganismos (8).

Essas enzimas tem sido descritas em várias espécies bacterianas (4, 9, 11, 12, 21, 23, 24) mas não em leveduras do gênero *Candida*.

O objetivo deste trabalho é verificar a produção daquelas enzimas por diferentes espécies da levedura em questão, isoladas da cavidade bucal.

Material e Métodos**1. Microrganismos testados - *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. tropicalis***

e *C. guillermondi*, isoladas da cavidade bucal de crianças portadoras de aparelhos ortodônticos.

2. Pesquisa das enzimas - Para a pesquisa de hialuronidase e condroitin sulfatase, empregou-se o método descrito por Smith & Willett (27); para a pesquisa de lecitinase, a técnica descrita por Paiva & Ito (20) e para a pesquisa de gelatinase, utilizou-se o método descrito por Hoeffler (12).

Resultados e Discussão

C. albicans é o agente causal da candidose, micose superficial de maior frequência na boca e se origina de infecções endógenas, devido a alterações locais ou sistêmicas do hospedeiro, traduzindo portanto em parasitismo ocasional (14).

A destruição de tecidos é uma característica primária na iniciação de gengivites, podendo posteriormente, levar à doença periodontal (30). Esse mecanismo destrutivo não está bem claro, mas determinadas enzimas, especialmente hialuronidase e condroitin sulfatase, produzidas por bactérias, têm sido sugeridas por vários autores, como possíveis mediadores (1, 10, 29, 32).

Estudos realizados por Takeuchi & Col. (30), mostram que tais enzimas quando localizadas na superfície do epitélio gengival ou tecido conectivo sub-epitelial, hidrolisam as substâncias intracelulares do epitélio, penetram na camada profunda do tecido gengival e iniciam a reação inflamatória.

No presente trabalho, Tabela 1, verificou-se que todas as amostras de *C. albicans* produziram hialuronidase e condroitin sulfatase, enquanto que as demais espécies não apresentaram atividade sobre o ácido hialurônico e sulfato de condroitin.

Essas enzimas não têm sido descritas em leveduras do gênero *Candida*, mas são encontradas em diferentes espécies bacterianas.

Hialuronidase tem sido observada em *Streptococcus hemolíticos* (3, 7), *Propionibacterium* (12, 13, 23), *Staphylococcus aureus* (18), *Streptococcus mitis* (26, 33), *S. milleri* (8), *Fusobacterium* e *Veillonella* (17, 31).

Condroitin sulfatase tem sido descrita em *S. milleri* (8), *Fusobacterium*, *Bacteroides* e *Veillonella* (31).

Nenhuma das amostras de *C. albicans* produziu lecitinase enquanto que apenas 2 das 17 amostras de *C. parapsilosis*, produziram essa enzima. Esses resultados, contrariam os de outros autores, que têm verificado a produção de fosfolipase (2, 6, 22, 28) em *C. albicans* e parece estar associado com a virulência dessa levedura.

A atividade proteolítica não foi observada em nenhuma das 25 amostras de *C. albicans*, mas foi observada em 4 das 17 espécies de *C. parapsilosis* e em 4 das 6 amostras de *C. krusei*. Enzima com essa atividade tem sido detectada em *C. albicans* por outros autores (16, 25) e também parece estar relacionada com a virulência para camundongos pois, amostras mutantes proteinase-deficiente de *C. albicans* são menos virulentas quando inoculadas intravenosamente nesses animais (16). Essa diferença de resultado talvez se deva ao fato de termos utilizado metodologia diferente para detecção dessa enzima. No momento, outros trabalhos estão em desenvolvimento em nossos laboratórios com o objetivo de elucidar essa questão.

Tabela 1 - Hialuronidase, condroitin sulfatase, lecitinase, gelatinase, produzidas por diferentes espécies de leveduras do gênero *Candida*.
Símbolos: * = Nº de amostras testadas; ** = Nº de amostras positivas.

Microrganismo	Hialuro-nidase	Condroitin-sulfatase	Leciti-nase	Gelati-nase
<i>C. albicans</i>	25*/25**	25/25	25/0	25/0
<i>C. parapsilosis</i>	17/0	17/0	17/2	17/4
<i>C. krusei</i>	6/0	6/0	6/0	6/4
<i>C. tropicalis</i>	6/0	6/0	6/0	6/0
<i>C. guillermondi</i>	5/0	5/0	5/0	5/0

Agradecimento

Este trabalho foi financiado pela FAPESP-Processo 85/3590-1 e CPE/RUNESP-Processo 4628/85.

Referências Bibliográficas

1. Aisenberg, M.S. & Aisenberg, A.D. - Hyaluronidase in periodontal disease. *Oral Surg.*, 4:3 17-320, 1951.
2. Barret-Bee, K.; Hayes, Y.; Wilson, R.G. & Ryley, J.F. - A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, 131:1217-1221, 1985.
3. Benchetrit, L.C.; Avelino, C.C. & Oliveira, C.M. - Serotypes and extra cellular hyaluronidase of group A Streptococci. *Rev. Microbiol.*, 15:35-38, 1984.
4. Braude, A.I. - *Microbiology*. Philadelphia, W.B. Saunders, 845p., 1982.
5. Cimasoni, G. & Held, A.J. - Intracellular mucopolysaccharides in human gingival epithelium. *Arch oral Biol.*, 9:751-752, 1964.
6. Costa, A.L.; Costa, G.; Misefari, A. & Amato, A. - Montone di ceppi patogeni di *Candida albicans*. Atti, Società peloritana di scienze fisiche, matematiche e naturali, Messina, 14:93-101, 1968.
7. Crawley, N. - Hyaluronidase production by hemolytic Streptococci of human origin. *J. Pathol. Bact.*, 56:27-35, 1944.
8. Dahlén, G.; Wikstrom, M. & Moller, A. - Production of histolytic enzymes by a combination of oral bacteria with known pathogenicity. *J. dent. Res.*, 62:1041-1044, 1983.
9. Evans, D.G. & Wardlaw, A.C. - Gelatinase and collagenase production by certain species of *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.*, 8:481-487, 1953.
10. Gaffer, A.; Coleman, E.J. & Marcusen, H.W. - Penetration of dental plaque components intra gingiva: sequential topical treatments with hyaluronidase and streptococcal polysaccharides in rats. *J. Periodontol.*, 52:197-205, 1981.
11. Gillespie, W.A. & Alder, V.G. - Production of opacity in egg-yolk by coagulase-positive staphylococci. *J. Path. Bact.*, 64:187, 1952.
12. Hoeffler, U. - Enzymatic and hemolytic properties of *Propionibacterium acnes* and related bacteria. *J. clin. Microbiol.*, 6:555-558, 1977.
13. Hoffler, U. - Production of hyaluronidase by propionibacteria from different origins. *Zbl. Bakt. Hyg.*, I. Abt. Orig. A, 245:123-129, 1979.
14. Lacaz, C.S.; Minami, P.S. & Purchio, A. - O grande mundo dos fungos. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, 225p., 1970.
15. Lederman, H.M.; Hayashi, J.A. & Bahn, A.N. - Chondroitin sulfatase in oral bacteria. *J. dent. Res.*, 51:206, 1972.
16. MacDonald, F. & Odds, F.C. - Virulence for mice of a proteinase-secreting strain of *Candida albicans* and a proteinase-deficient mutant. *J. Gen. Microbiol.*, 129:431-438, 1983.
17. MacDonald, J.B.; Gibbons, R.J. & Socransky, S.S. - Bacterial mechanisms in periodontal disease. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85:467, 1960.
18. Mahler, I.R. & Lisanti, V.F. - Hyaluronidase production microorganisms from human saliva. *Oral Surg.*, 5:1235-1240, 1952.
19. Nolte, W.A. - *Oral microbiology with basic microbiology and immunology*. 4.ed. London, C.V. Mosby Co., 795p., 1982.
20. Paiva, G.M. & Ito, I.I. - Eficiência da prova da lecitinase em 100 amostras relativamente às provas de coagulase, fermentação do manitol e DNase, na diferenciação entre "*Staphylococcus aureus*" e "*S. epidermidis*". *Rev. bras. Anál. Clin.*, 4:13, 1972.
21. Pike, R. - The production of hyaluronic acid and Hyaluronidase some strains of Group A streptococci. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 52:1070-1073, 1950.
22. Price, M.G.; Wilkinson, I.D. & Gentry, L.O. - Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20:7-14, 1982.
23. Puvel, S.M. & Reisner, R.M. - The production of hyaluronidase (Hyaluronate lyase) by *Corynebacterium acnes*. *J. Invest. Dermatol.*, 58:66-70, 1972.

24. Rosan, B. & Williams, N.B. - Hyaluronidase production by oral enterococci. *Arch. oral Biol.*, 9:291-298, 1964.
25. Ruchel, R.; Tegeler, R. & Trost, M. - A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20:233-244, 1982.
26. Schultz-Haut, S.D. & Scherp, H.W. - Production of hyaluronidase and beta-glucuronidase by viridans streptococci isolated from gingival crevices. *J. dent. Res.*, 34:924-929, 1955.
27. Smith, R.F. & Williett, N.P. - Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 16:1434-1436, 1968.
28. Souza, E.M.B. - *Candida albicans* (ROBIN) Berkhouit 1923: sorotipagem e estudo de alguns aspectos morfo-fisiológicos de amostras isoladas de diversos materiais clínicos, 1988 (Dissertação-Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).
29. Stefen, E.K. & Henges, D.I. - Hydrolytic enzymes of anaerobic bacteria isolated from human infections. *J. clin. Microbiol.*, 14:153-156, 1981.
30. Takeuchi, H.; Hori, Y.; Kanehisa, J.; Tani, A.; Takai, R. & Sagawa, H. - Bacterial chondroitinase ABC and hyaluronidase in human dental plaque and inflamed gingiva. *J. Osaka Dental Univ.*, 16:183-187, 1982.
31. Tam, Y.C.; Harvey, R.F. & Chan, E.C.S. - Chondroitin sulfatase producing and hyaluronidase producing oral bacteria associated with periodontal disease. *J. Canad. Dent. Assoc.*, 115-120, 1982.
32. Thilander, H. - The effect of leucocytic enzymes activity on the structure of the gingival pocket epithelium in man. *Acta Odont. Scand.*, 21:431-451, 1963.
33. Uzeda, M. - Mucopolissarises (Hialuronidase e condrosulfatase) em componentes da microbiota do sulco gengival humano. Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, 88p., 1973. (Tese - Mestrado).
34. Willis, A.T. - The lipolytic activity of some clostridia. *J. Path. Bact.*, 80:79, 1960.

SCP PRODUCTION FROM ORGANIC ACIDS WITH CANDIDA UTILIS

Francisco Maugeri-Filho

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

Recebido para publicação em 28/04/88

& Gerard Goma

Institut National des Sciences Appliquées
Laboratoire de Genie Biochimique
31077 Toulouse, France

Summary

The growth of *Candida utilis* in batch and substrate limited continuous culture was performed on organic acids such as acetic, propionic and butyric acids as carbon source. These compounds are toxic and show high inhibitory effects at relatively low concentrations. Biomass yield is depressed when the initial substrate concentration is increased. Yields in continuous culture were considerably better than in batch culture. Cell maintenance on the organic acids was studied. The microorganism can utilize 5% to 44.8% of substrate for maintenance. *Candida utilis* grew quite well on acid effluent from acidogenic fermentations. The use of this effluent for SCP production was shown to be possible and interesting.

Resumo

Produção de proteína de organismos unicelulares a partir de ácidos orgânicos com Candida utilis

O crescimento de *Candida utilis* foi estudado em culturas em batelada e em culturas contínuas tendo como fonte de carbono ácido acético, ácido propiónico e ácido butírico. Estes compostos mostraram ser tóxicos e altamente inibidores em concentrações relativamente baixas. O rendimento de biomassa diminui à medida em que a concentração do substrato aumenta. Estudou-se igualmente a manutenção celular em ácidos orgânicos. O microrganismo pode utilizar de 5 a 44,8% de substrato para manutenção. *Candida utilis* desenvolveu-se bem em efluentes ácidos provenientes de fermentação acidogênica. Mostrou-se que o uso destes efluentes para produção de SCP (proteína de organismo unicelulares) é possível e interessante.

Introduction

The use of supernatants from anaerobic fermentation for SCP production was proposed by Henry in 1975 (7) and Henry & Col. in 1976 (8). Acid effluents from food industries are also used for SCP production (16, 17). Yeast cultures growing on acid effluents from chemical industries is a well studied subject (13, 18). A new process for SCP production from acid was developed by Kinsel and Leather (10) where the inhibition effect by acetic acid was minimized. Cama and Edwards (2) suggested SCP production from the acetic acid of industrial wastes. Edwards & Col.

(5) studied the growth of *Candida utilis* on acetate in rea-batch and continuous culture. The yields in continuous fermentation were better than in feed-batch fermentation. A relatively high specific growth (0.54 h^{-1}) was obtained.

Models of growth and productivity were proposed by different authors (2, 9, 11).

Besides the industrial residue source of organic acids, they can be obtained from the acidogenic phase of biological methane production. It is possible and relatively easy to stop the production of methane in order to accumulate acids in the digestion broth. This can be done by the reduction of holding time in the reactor or by favoring propionic acid accumulation (natural inhibitor of methane production) by a drop in the pH (14, 15), by the addition of CCl_4 or CHCl_3 (3), by the addition of monensine (14), or by the use of a plug-flow fermenter (4). *Candida utilis* can grow easily on organic acids (12) but the inhibitory effect of these substrates depress the biomass yield and increase the cells maintenance. The maintenance coefficient can be low in a substrate-limited culture (11) (0.013g acetic acid/g dry biomass, h) or considerably higher (5) (0.17g acetic acid/g dry biomass, h) in an excess of substrate. The higher the maintenance coefficient the higher is the use of substrate for cell maintenance and this phenomena in SCP production becomes economically more significant. In this article the kinetics of growth and substrate inhibition was studied and the use of substrate for cell maintenance was estimated. Batch and continuous culture of *Candida utilis* on acetic acid, propionic acid, butyric acid, and on mixture of these acids were performed.

Material and Methods

Organism and culture conditions

The strain of *Candida utilis* used in this study was obtained from the culture of Institut Pasteur. The organism was routinely grow on Potato-Dextrose-Agar and stored at 10-15°C.

The mineral medium used in the experiments had the following composition in g. l^{-1} : KH_2PO_4 , 1.0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3.0; MgSO_4 , 0.244; FeSO_4 , 0.00346; ZnSO_4 , 0.00360; EDTA, 0.00680; yeast extract, 0.01. The carbon source used in the batch fermentation had the composition described in Table 1.

In continuous culture the carbon source was a 230g. l^{-1} solution of acetic acid or a mixture of 60% acetic, 20% propionic and 20% butyric acids, kept in a reservoir apart from the mineral medium.

The fermentation were carried out in a 30l useful volume glass stirred pilot fermenter, operated in a batch and continuous mode at 30°C, with 20l of culture medium. The agitation and aeration were 500 rpm for the former and 0.42 VVM for the latter. The culture pH values were 6.0 for batch fermentations and 3.0, 3.5 and 4.0 for continuous cultures.

Assays - The organic acids in this research were determined gas chromatographically using a 50cm column packed with Porapak Q (N_2 carrier gas; detector, injector and column temperatures were 180°C, 220°C and 150°C respectively).

Dry weights were determined by filtration of cell suspensions in a 0.45 μ Sartorius membrane and drying at 60°C in a vacuum drying oven.

Results and Discussion

The results of the growth of *Candida utilis* on M1 (4.40g/l of acetic acid), M2

Table 1 - Carbon sources for batch fermentation media.

Symbols: * = Effluent from acidogenic fermentation

medium carbon sources (g/l)	M1	M2	M3	M4	M5	*M6
acetic acid	variable	-	-	5.40	5.90	18.50
propionic acid	-	4.40	-	-	1.90	0.30
butyric acid	-	-	4.40	3.70	2.08	6.00
reducing sugars	-	-	-	-	-	3.50
Total	variable	4.40	4.40	9.10	9.88	28.50

Table 2 - Maximum specific growth rate (μ_{\max}) and average biomass yield ($Y_{X/S}$) on different organic acids.

Carbon source	μ_{\max} (h^{-1})	$Y_{X/S}$ (g cells.g sub. $^{-1}$)
Acetic acid	0.48	0.39
Propionic acid	0.20	0.37
Butyric acid	0.32	0.40

and M3 media are shown in Table 2. The microorganisms grows fast on acetic acid, and slower on propionic acid and butyric acid. The maximum specific growth rate changed significantly while the average biomass yields were similar.

When *Candida utilis* grew on M4, M5 and M6 media, a diauxie effect could be observed. Also the average yields in these experiments are very similar: 0.33 on M4 medium, 0.36 on M5 medium and 0.35 on M6 medium.

In order to study the inhibitory effect on organic acids, cultures of *Candida utilis* on different acetic acid concentrations were made. Maximum specific growth rates, average biomass yield coefficients and exponential biomass yield coefficients (biomass yields in exponential phase of growth) were determined and plotted against the initial concentration of acetic acid (Figure 1). The curve $\mu = f(S)$ is a characteristic curve of substrate inhibition. A clear decreasing of the μ values is observed at high substrate concentrations. Also the biomass yields are depressed when the initial substrate concentration is increased.

A mathematical model of the rate of microbial growth on inhibitory levels of toxic substrates was essayed using the equation (2), $\mu = \mu_{\max} S / (K_S + S + S^2 / K_i)$ (1) where: μ = specific growth rate

S = substrate concentration

μ_{\max} = maximum specific growth rate

K_S = saturation constant

K_i = inhibitor constant

The three parameters, μ_{\max} , K_S and K_i were determined by the following method: if $S \gg K_S$ equation 1 becomes: $\mu = \mu_{\max} \frac{K_i}{S + K_i}$ (2)

and if $S \ll K_i$ it becomes: $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S}$ (3)

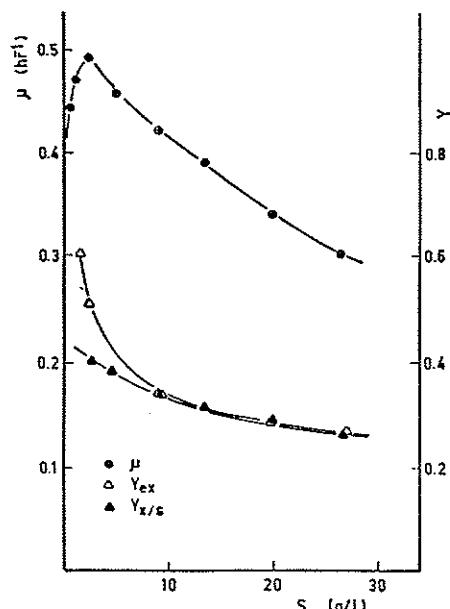
By fitting $1/\mu$ vs S from equation 2 and $1/\mu$ vs $1/S$ from equation 3, the values of K_i , μ_{\max} and K_S can be obtained. The values are: $\mu_{\max} = 0.53 h^{-1}$, $K_i = 34.46 g \cdot l^{-1}$ and $K_S = 0.0546 g \cdot l^{-1}$.

Specific growth rates calculated from equation 1 are compared with experimental data in Figure 2. The fitted curve does not differ from the experimental data.

Studies on cell maintenance were performed using batch and continuous culture data in the equation.

$$\frac{1}{Y_{X/S}} = \frac{1}{Y_X} + \frac{m}{\mu} \quad (4)$$

Figure 1 - Effect of initial substrate concentration on maximum specific growth rate (μ), exponential biomassas yield (Y_{ex}), and average biomass yield ($Y_{X/S}$).



where:
 $Y_{X/S}$ = average growth yield
 Y_X = true growth yield
 m = maintenance coefficient

Figure 2 - Comparison of simulated and experimentally determined specific growth rates (μ) vs initial substrate concentration.

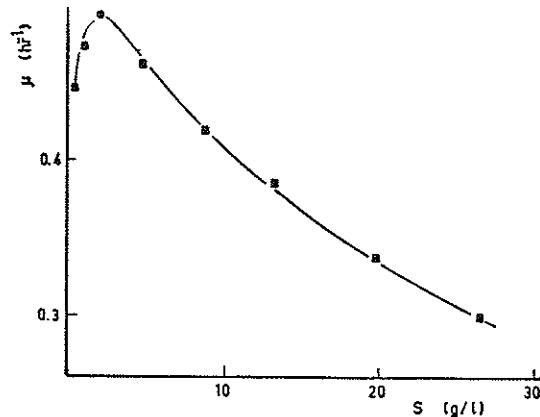
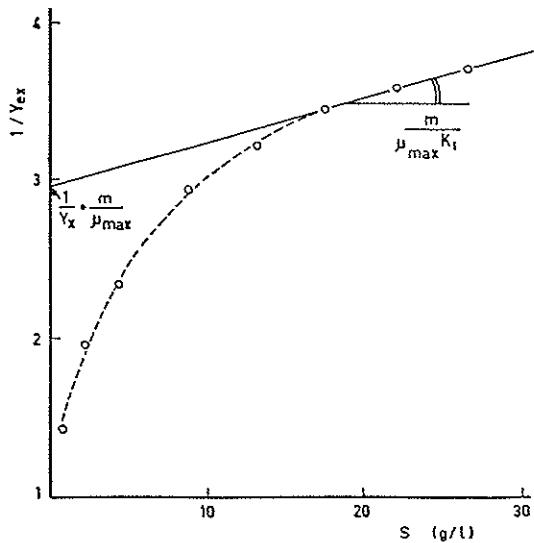


Figure 3 - $1/Y_{ex}$ data plotted against substrate concentration (S) for determination of m and Y_x .



In batch cultures during the exponential phase μ is constant and equal to μ_{max} . If Y_x/S and m are also constants, Y_x/S in this phase will be constant. In addition, equation 1 can be combined with equation 4 to give the following equation in batch cultures.

$$\frac{1}{Y_{ex}} = \frac{1}{Y_x} + \frac{m}{\mu_{max}} \left(1 + \frac{K_s}{S} + \frac{S}{K_i} \right) \quad (5)$$

The plot $1/Y_{ex}$ vs S must be a straight line with slope, $\frac{m}{\mu_{max} \cdot K_i}$ and intercept, $\frac{1}{Y_x} + \frac{m}{\mu_{max}}$ if m is constant at $S \gg K_s$.

This is effectively observed Figure 3.

The graphical determination for m and Y_x gives 0.516 (g cells. g sub.⁻¹.h⁻¹) for the former and 0.50 (g cells. g sub.⁻¹) for the latter. Also, if m is constant at $S \ll K_i$ the plot $1/Y_{ex}$ vs $1/S$ must be a straight line with slope $m \cdot K_s / \mu_{max}$. However the straight line is not observed. It is reasonable therefore to consider m not constant at low values of S. In addition, if Y_x is considered constant and independent of S, equation 5 can give the variation of m at different values of S. In Figure 4 is possible to see the values of m calculated from equation 5. The maintenance coefficient increases at low values of S, and becomes constant at high substrate concentration. The value m attained 0.51 (g cells. g sub.⁻¹.h⁻¹) and this represents a very high quantity of substrate used for cell maintenance.

If equation 4 is considered in continuous culture, in the steady state, it becomes,

$$\frac{1}{Y_{x/s}} = \frac{1}{Y_x} + \frac{m}{D} \quad (6)$$

where: D = dilution rate

If Y_x and m are constants, the plot $1/Y_{x/s}$ vs $1/D$ will be a straight line. The slope will give m and the intercept on the ordinate will give $1/Y_x$. Figures 5 and 6 show that $1/Y_x$ is effectively on linear dependence of $1/D$ for the cultures on acetic acid and on the mixture at three different pH values 3.0, 3.5 and 4.0.

Figure 4 - Simulated variation of maintenance coefficient (m) vs substrate concentration (s), calculated from equation 5 ($\mu_{max} = 0.53 \text{ h}^{-1}$, $K_s = 0.0546 \text{ g sub.}^{-1}$, $K_i = 34.46 \text{ g sub.}^{-1}$ and $Y_X = 0.5 \text{ g cells. g sub.}^{-1}$).

The maintenance coefficients calculated from Figures 5 and 6 are lower than the estimated values from equation 5 for batch cultures. Also in continuous cultures the true growth yield (Y_X) is independent of the pH. On acetic acid cultures the value for Y_X ($0.430 \text{ g cells. g sub.}^{-1}$), is lower than that on the mixture culture ($0.588 \text{ g cells. g sub.}^{-1}$). The different values for m and Y_X obtained in continuous culture can be seen in Table 3. The lowest value for m is $0.027 \text{ (g cells. g sub.}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$ on the mixture at pH 4.0.

Also in continuous cultures the average biomass yields are higher than in batch cultures. Table 4 shows the various data for average biomass yields obtained from continuous and batch cultures. Continuous cultures on the mixture produce better average yields than both continuous and batch cultures on acetic acid. The best result is $0.548 \text{ (g cells g sub.}^{-1})$.

The percentage of substrate used for cell maintenance can be estimated from the equation,

$$\phi_m = \frac{m}{D/Y_X + m} \cdot 100$$

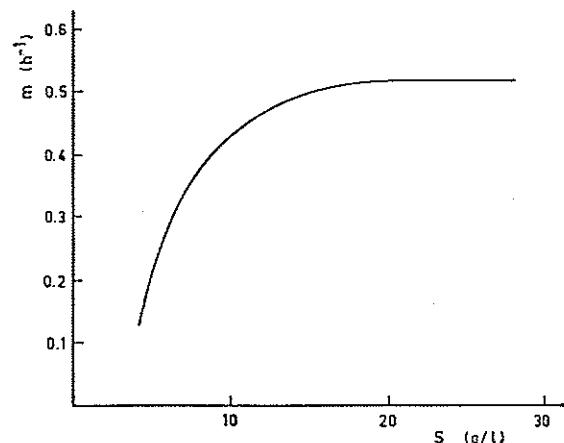


Figure 5 - Determination of maintenance coefficient and the true growth yield at different pHs in continuous culture on acetic acid.

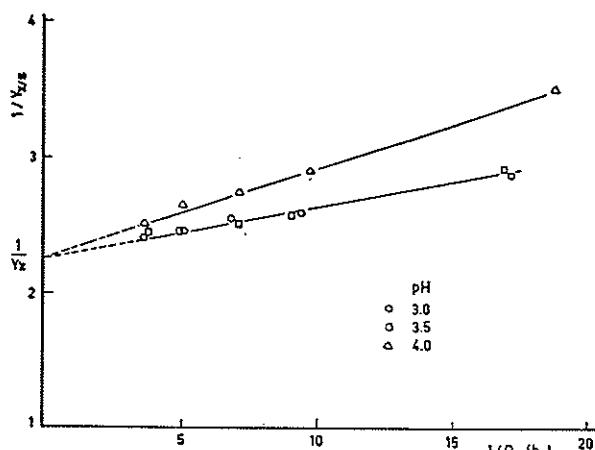


Table 5 shows the values for ϕ_m in continuous culture under different conditions. The most important feature of these results is the decrease in substrate utilization for cell maintenance with increase in the dilution rate. The amount of substrate used for maintenance can vary from 5.5% to 35% on acetic acid and from 6.2% to 44.8% on the organic acid mixture.

Conclusions

In this study of SCP production from organic acids with *Candida utilis*, it was possible to verify some interesting facts.

Organic acid can be used as substrate for biomass production in spite of its strong inhibitory effect. In batch culture this effect is more drastic than in continuous culture. In fact, substrate limited chemostat cultures produce better results, such as an increase in average yields, by minimizing the inhibition. Yields in batch culture vary from 30% to 40% while in continuous cultures they

Table 3 - Data for m and Y_X in continuous culture on acetic acid and on an organic acid mixture.

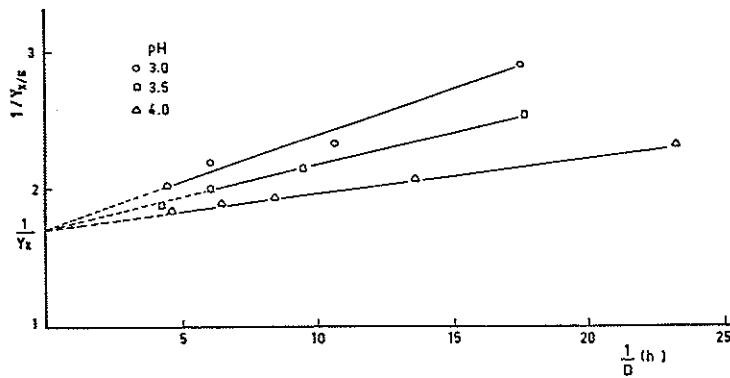
pH	Acetic acid		Mixture	
	m	Y_X	m	Y_X
	g cells g sub.h	g cells g sub.	g cells g sub.h	g cells g sub.
3.0	0.032	0.430	0.069	0.588
3.5	0.032	0.430	0.049	0.588
4.0	0.063	0.430	0.027	0.588

reach 44% on acetic acid and 55% on a mixture of acetic, propionic and butyric acids. The use of an organic acid mixture, like the acid effluent from an acidogenic process, can give high overall biomass yields in SCP production.

The estimation of maintenance coefficients showed that the substrate used for cell maintenance vary from 5.5% to 44.8%. This depends on the dilution rate and substrate concentration. In general, the higher the dilution rate and the lower the substrate concentration, the lower is the use of substrate for cell maintenance.

The use of acid effluent from anaerobic digestion for SCP production is possible and interesting, since good yields can be obtained in substrate limited continuous culture, and wastes which can be biologically converted into organic acids are widely available.

Figure 6 - Determination of maintenance coefficient and the true growth yield at different pHs in continuous culture on an organic acid mixture.



References

1. Abbot, B.J. & Clamen, A. The relation ship of substrat growth rate maintenance coefficient to single cell protein production Biotechnol. Bioeng., 15:117-127, 1973.

Table 4 - Average yields in batch cultures (BC) and continuous cultures (CC) on acetic acid on an organic acid mixture at different initial substrate concentrations (S).

Carbon source/ culture	$s(\text{g} \cdot \text{l}^{-1})$				
	3.44	4.62	6.57	8.68	15.96
Acetic acid BC	0.390	0.380	0.370	0.350	0.295
Mixture CC	0.548	0.537	0.518	0.498	0.446

Table 5 - Percentage of substrate (ϕ_m w/w) used for maintenance in continuous culture on acetic acid and on the mixture at different pHs and dilution rates (D).

$D(\text{h}^{-1})$	Acetic acid			Mixture		
	3.0	3.5	4.0	3.0	3.5	4.0
0.05	21.6	21.1	35.1	44.8	36.5	24.1
0.125	9.9	9.9	17.8	24.5	18.7	11.3
0.178	7.2	7.2	13.2	18.6	13.9	8.2
0.238	5.5	5.5	10.2	14.6	10.5	6.2

2. Andrews, J.F. A mathematical model for the continuous culture of microorganisms utilizing inhibitory substrates, *Biotechnol. Bioeng.*, 10:707, 1968.
3. Cama, F.J. & Edwards, Y.H. The growth of *Candida utilis* on sodium acetate, *J. Ferment. Technol.*, 48:787-794, 1970.
4. Chynoweth, O.P. & Mah, R.A. Volatile acid formation in sludge digestion. *Adv. Chem. Ser.*, 105:41-48, 1971.
5. De La Torre, I. Contribution à l'étude cinétique de la phase acidogène de la fermentation métanogène Docteur, Inginieur Thesis INSA, Toulouse, France, 1980.
6. Edwards, V.H.; Gottschalk, M.J.; Noojin, A.Y.; Tuthill, L.B. & Tannahill, A.L. Extended culture: the growth of *Candida utilis* at controlled acetate concentrations. *Biotechnol. Bioeng.*, 12:975-999, 1970.
7. Goma, G.; Moletta, R. & Maugeri-Filho, F. Importance and usefulness of the concept of maintenance in S.C.P. production. *Advances in Biotechnology*, vol.II:453-459, 1981.
8. Henry, D.P. *Candida ingens* as a potential fodder protein. *Austr. Vet. J.*, 51:317-319, 1975.
9. Henry, D.P.; Thomson, R.H.; Sizemore, D.T. & D'Leary, J.A. Study of *Candida utilis* growth on the supernatant devised from the anaerobic fermentation of monogastric animal wastes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31:813-818, 1976.
10. Jackson, J.V. & Edwards, V.H. Kinetics of substrate inhibition of exponential yeast growth. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:943-964, 1975.
11. Kinsel, N.A. & Leathen, W.W. - U.S. Patent n° 3, 775, 252; 1973.
12. Ko, R.Y. & Edwards, V.H. Transient kinetics of yeasts growth in batch and continuous culture with an inhibitory carbon and energy source. *Biotechnol. Bioeng.*, 17:965-983, 1975.
13. Maugeri-Filho, F. Etude d'une nouvelle voie de production de biomasse microbienne à partir de cellulose, Docteur Ingenieur Thesis, INSA, Toulouse, France, 1980.
14. Nakamura, J. - U.S. Patent n° 3, 887, 435; 1975.
15. Plaine, M.J. Volatile fatty acid fermentation for liquid fuel production. *Division of Chemical Technology Research Review*, 1978.
16. Plaine, M.J. Microbiol conversion of cereal straw and bran into volatile acids. Key intermediates in the production of liquid fuels. *Proceedings of Cereal Chem. 29th Ann. Conference*, Adelaide Australia, 1979.
17. Ruiz, L.P.; Gurnsey, J.C. & Short, J.L. Reduction of lactic acid, non protein nitrogen, and ash in lactic acid whey by *Candida ingens* culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35:771-776, 1978.
18. Stevenson, K.E.; Black, D.E. & Costilow, R.N. Aerobic fermentation of pickle process brine by *Candida utilis*. *J. Food Science*, 44:181-185, 1979.
19. Woldendorp, J.W. - U.S. patent n° 3, 775, 252; 1971.

STUDY OF AN ORNAMENTAL BIRD FLOCK OVER A PERIOD OF THREE YEARS: INCIDENCE OF AVIAN INFLUENZA VIRUSES

José Nelson dos Santos Silva Couceiro
Raimundo Diogo Machado
Eliane dos Santos Silva Couceiro
& Maurici Curié Cabral

Recebido para publicação em 13/11/87

Deptº de Virologia
Instituto de Microbiologia - UFRJ, Brazil
Centro de Ciências da Saúde
Bloco I - Ilha do Fundão
21944 Rio de Janeiro RJ

Summary

The birds apparently healthy throughout the investigation period had their feces harvested and inoculated in fertile eggs. The identification of the isolates was done by double immunodiffusion (DI), hemagglutination inhibition (HI) and neuraminidase inhibition (NI) tests. The study of an ornamental bird flock resulted in the isolation of 11 strains of Influenza A subtypes H₆N₂ and H₇N₁, in 360 fecal samples examined. The cases of isolation occurred from May to September and from November to January. They have shown serological relationship with A/Hong Kong/68 and A/FM/1/47 with antigenic pattern H₃N₂ and H₁N₁, respectively.

Resumo

Os pássaros aparentemente saudáveis, durante o período de investigação, tiveram suas fezes coletadas e inoculadas em ovos embrionados. A identificação dos isolados foi feita por teste de imunodifusão dupla (DI), inibição de hemagglutinação (HI) e inibição de neuraminidase (NI). O estudo de uma comunidade de aves ornamentais resultou no isolamento de 11 amostras de vírus Influenza A, subtipos H₆N₂ e H₇N₁, em 360 amostras de fezes examinadas. Casos de isolamentos ocorreram de Maio a Setembro e de Novembro a Janeiro. Eles mostraram relação sorológica com amostras A/Hong Kong/68 e A/FM/1/47 com fórmula antígenica H₃N₂ e H₁N₁, respectivamente.

Introduction

Almost in every regions, isolation of Influenza virus has been described, from clinical specimens originating from wild birds which, through migration, disseminate the disease to different areas. Studies have been done, demonstrating the isolation of Influenza virus strains, with distinct antigenic pattern (24, 27, 32, 34, 36, 37).

These strains have also been isolated from ornamental, domestic or grange birds all over world, showing high antigenic diversity, with isolation related or not to clinic features (1, 5, 6, 8, 13, 14, 17, 22, 30).

Investigation supported by CAPES/UFRJ research grants.

Rev. Microbiol., São Paulo, 19(4):453-458, Out./Dez. 1988.

In Brazil, particularly in Rio de Janeiro city, isolation of Influenza A virus strains have been achieved, specifically H₆N₂ and H₃N₈ (8, 9). It has been observed in the United States (3) and in other countries, significative specific antibody levels, confirming the large scale dissemination of the infection (4, 5, 7). It is also observed that, sometimes, the affected birds show serious or even lethal clinical diseases (12, 15, 21, 33).

The significative isolation percentage of a large diversity of viral strains and the presence of respective antibodies to Influenza A and Newcastle disease virus (NDV), all over the world, stimulated our interest in studying the circulation of these viruses, amongst Brazilian birds.

Material and Methods

360 fresh fecal samples from ornamental birds were harvested over a period of 36 months, 10 per month, from bird cages, in the district of Lins de Vasconcelos, suburb of Rio de Janeiro city. Several species of birds in a total of 110, were classified in four families; Faringidae, Fringillidae, Psitacidae and Picidae.

Throughout the years, the birds were kept confined in metal-covered cages, in contact with life-free birds such as sparrows (*Passer domesticus*), doves (*Columba spix*) and common waxbill (*Estrilda cinerea*), which frequently visited the area where the cages in which the birds examined birds were.

The cages were cleaned every day, removing fecal material and food residues, and were supplied with food: birdseed, vitamin complex (A, B₁, C, mineral oil and ground corn), vegetables and water. All over the investigation period, the birds seemed to be healthy. The fecal samples were grouped in series of 10 (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, V, X, Y, Z, A', B', C', D', E', F', G', H', I', J') collected each month, from July 1981 until June 1984.

Host - Conventional fertile eggs from Leghorn chicken were used, with 9-12 day old embryos (25).

Viral strains and standard sera - Twelve different standard avian Influenza virus strains obtained from National Institute for Medical Research (Mill Hill, London) and from Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) were used: A/turkey/Weybridge/79 (H₁N₁), A/duck/Germany/1215/73 (H₂N₃), A/duck/Ukraine/63 (H₃N₈), A/duck/Czechoslovakia/56 (H₄N₆), A/tern/S.Africa/61 (H₅N₃), A/Shearwater/E.Aust/72 (H₆N₅), A/FPV/Rostock/34 (H₇N₁), A/turkey/Ontario/6118/68 (H₈N₄), A/turkey/Wisconsin/66 (H₉N₂), A/chicken/Germany/"N"/49 (H₁₀N₇), A/duck/England/56 (H₁₁N₆) and A/duck/Alberta/60/76 (H₁₂N₅). Standard strains and sera for NDV (SO-93 - EMBRAPA and Lasota) were provided by EMBRAPA - Rio de Janeiro. They were grown in conventional fertile eggs, to obtain viral stock.

Immune sera prepared in goats for human and avian Influenza virus and viral hemagglutinins and neuraminidases were provided by St. Jude Children's Research Hospital (USA) were related to strains: A/Hong Kong/68 (H₃N₂), A/Port/Chalmers/1/72 (H₃N₂), A/EM/1/47 (H₁N₁), B/HK/15/72 (H₃N₂), A/turkey/Weybridge/79 (H₁N₁), A/duck/Germany/1215/73 (H₂N₃), A/duck/Ukraine/63 (H₃N₈), A/duck/Czechoslovakia/56 (H₄N₆), A/tern/S./Africa/61 (H₅N₃), A/Shearwater/E.Aust./72 (H₆N₅), A/FPV/Rostock/34 (H₇N₁), A/turkey/Ontario/6118/68 (H₈N₄), A/turkey/Wisconsin/66 (H₉N₂), A/chicken/Germany/"N"/49 (H₁₀N₅), A/duck/England/56 (H₁₁N₆) and A/duck/Alberta/60/76 (H₁₂N₅).

The sera for hemagglutination inhibition test (HI) were treated with receptor destroying enzyme (RDE) and with a 50% (v/v) suspension of goose erythrocytes and inactivated at 56°C/30 min. These sera for neuraminidase inhibition (NI) and double immunodiffusion (DI) tests were treated only by inactivation at 56°C/30 minutes (7, 11, 20).

Erythrocytes, solutions and 1.5% agarose solution - Erythrocytes suspensions and solutions were used as in Couceiro (7). 1.5% agarose solution was prepared in PBS, as in Couceiro (10).

Methods

For feces collection, the fecal materials were harvested in the morning (from the bottom of the cages with a spatula), after cleaning the cages, to be sure of viral viability. Materials were then immersed in 5.0ml of Gey ABC solution with antibiotics and processed, as described elsewhere (7).

All the materials were passaged three times in fertile eggs and submitted to hemagglutination test (HA) (31); clinical materials were considered negative if there was no detectable HA titer after the third passage in fertile eggs.

Fluids were considered positives if they had HA titers equal or higher than 16. The final titer was considered as the highest dilution with 100% hemagglutination. Positive fluids were passaged to obtain a minimum titer of 256 for viral concentration.

Identification of the isolates - The identification process were started with the concentration of the isolates and standard viruses by ultracentrifugation (23). The hemagglutination inhibition (HI), neuraminidase inhibition (NI) and double immunodiffusion tests were used in identification of viral samples, with utilization of erythrocytes, erythrocytes/peanuts lectin and agarose slides, respectively (7, 19, 28, 31).

Results

The examination of fecal samples of the ornamental birds, in a period of 36 months, resulted in the isolation of viruses classified as Influenza A, with hemagglutinin H₆ and H₇, by DI and HI tests, followed by NI tests, which revealed the neuraminidase types N₁ and N₂ (Table 1 and 2).

Figure 1 shows monthly circulation of the strains H₆N₂ and H₇N₁, throughout the three-year investigation, amongst the ornamental birds.

Table 1 - Identification of isolated viruses by DI and HI tests, with standard anti-sera, against Influenzavirus hemagglutinins.

Symbols: (+) = Titer equal to 20 by HI test.

Nº	Series	Isolated strains	Month/year	Group double immunodiffusion	Standard anti-sera Hemagglutinin subtypes (HI)												
					H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	H ₅	H ₆	H ₇	H ₈	H ₉	H ₁₀	H ₁₁	H ₁₂	H ₁₃
10	C	Sep/81	A	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	K	May/82	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1	L	Jun/82	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
6	O	Sep/82	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	O	Sep/82	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
3	Q	Nov/82	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	Q	Nov/82	A	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
2	R	Dec/82	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1	U	Mar/83	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
1	W	May/83	A	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

Discussion

A flock of ornamental birds in cage (sentinel birds) was chosen for the subject of this study, in an area susceptible to the incursion of wild birds.

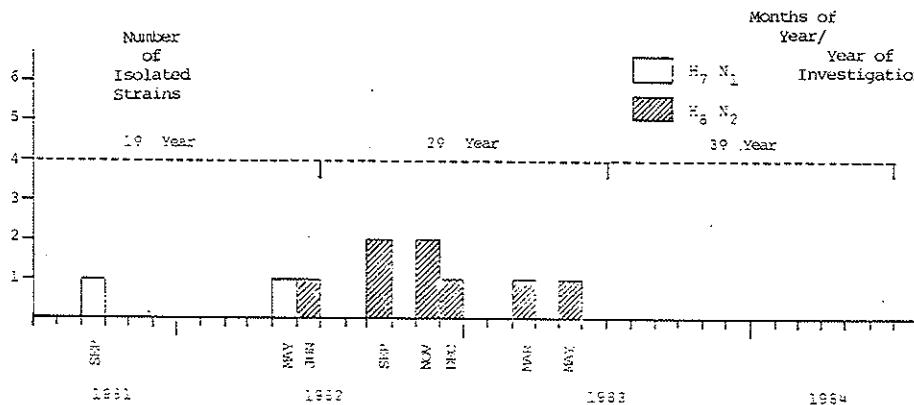
Replication of Influenza virus in intestinal mucosae has been described in ducks, with viral elimination in feces and in the respiratory tract, common to Influenza

virus and NDV (35). In our previous experience, studying 1735 clinical specimens harvested from the cloaca and oropharynx, we did not obtain success in viral isolation. The practice of harvesting feces, directly from stones in bird reservoir or from cages, has been regarded as a better methodology, so the present investigation was carried out by the use of this methodology (8, 9, 18).

Two different Influenza A viruses subtypes H₆N₂ and H₇N₁ (Tables 1 and 2) were isolated and identified by HI, DI and NI tests. These subtypes were observed, in different world regions, isolated from ornamental birds (5, 8, 9). It was observed in Hong Kong city, in a study of asymptomatic ducks, that there was a higher tendency for Myxo and Paramyxovirus isolation in summer months (29). In contrast, we did not find any significant difference in the percentages of isolation, through different months of the year. This fact could be explained by the climate of Rio de Janeiro city, where temperature is almost constant all over the year.

Figure 1, shows the number of strains isolated by month, throughout the three-year investigation, in a total of eleven isolates, all of them in the first and second years. It demonstrates a significant incidence of H₇N₁ serotype of Influenza A virus, with greatest intensity in the second year of investigation.

Figura 1 - Monthly isolation of Influenza virus strains (H₆N₂ and H₇N₁), during three years of investigation.



Influenza A virus strains antigenically similar to those isolated from humans, have been detected in many countries of the world. In our study, isolated strains H₆N₂ and H₇N₁ showed similarity, in neuraminidase subtypes, to strains isolated in human infections: A/Hong Kong/68 (H₃N₂) and A/FM/1/47 (H₁N₁). This could be explained by the contact with humans, in which the strains undergo a genetic recombination (5, 16, 18, 26, 29).

Our study was done in a bird flock in captivity, with eventual contact with wild birds. This fact lead us to the supposition of existence of intervening factors, in the infection process, such as agglomeration of birds or the propagation of virus through food or water (2).

Table 2 - Identification of Influenza virus A by NI test, with standard anti-sera, against Influenza virus neuraminidases. Symbols: (+) = Titer equal to 20 by NI test using peanuts agglutinin.

No	Series	Month/Year	Isolated strains								Standard anti-sera							
			N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₅	N ₆	N ₇	N ₈	N ₉	N ₁₀	N ₁₁	N ₁₂	N ₁₃	N ₁₄	N ₁₅	
10	C	Sep/81	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4	K	May/82	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	L	Jun/82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	O	Sep/82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	O	Sep/82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	Q	Nov/82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	Q	Nov/82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
2	R	Dec/82	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1	U	May/83	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Influenza A virus strains antigenically similar to those isolated from humans, have been detected in many countries of the world. In our study, isolated strains H₆N₂ and H₇N₁ showed similarity, in neuraminidase subtypes, to strains isolated in human infections: A/Hong Kong/68 (H₃N₂) and A/FM/1/47 (H₁N₁). This could be explained by the contact with humans, in which the strains undergo a genetic recombination (5, 16, 18, 26, 29).

Our study was done in a bird flock in captivity, with eventual contact with wild birds. This fact lead us to the supposition of existence of intervening factors, in the infection process, such as agglomeration of birds or the propagation of virus through food or water (2).

References

1. Aini, I & Ibrahim, A.L. Isolation of Influenza A from domestic ducks in Malaysia. *Vet. Rec.*, 118:130, 1986.
2. Alexander, D.J.; Parsons, G. & Marshall, R. Infection of fowls with Newcastle Disease Virus by food contaminated with pigeon feces. *Vet. Rec.*, 115:601-2, 1984.
3. Anraku, M.C.; Faria, W.C. & Takeyama, D.C. - Influenza aviária em aves silvestres brasileiras. I - Inquérito sorológico através de Imunodifusão. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 13:292-6, 1971.
4. Bahl, A.K.; Pomerey, B.S. & Easterday, B.C. Isolation of two turkey Influenza A Viruses in Minnesota. *Avian Dis.*, 19:375-84, 1975.
5. Boudreault, A.; Lecomte, J. & Hinshaw, V.S. Charactérisation antigenique des virus Influenza A isolés des oiseaux capturés dans l'Ontario, Le Québec & les Provinces Maritimes durant la saison 1977. *Rev. Can. Biol.*, 39:107-14, 1980.
6. Boudreault, A. & Lecomte, J. Isolement de virus Grippeux chez différentes espèces aviaires au Canada en 1968. *Rev. Can. Biol.*, 40:139-45, 1981.
7. Couceiro, J.N.S.S. - Inquérito virológico e sorológico de vírus Parainfluenza em crianças no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, 22:111-34, 1978.
8. Couceiro, J.N.S.S.; Chaves, J.R.S.; Brandão, C.T.P. & Machado, R.D. - Isolamento e caracterização de vírus Influenza A, em aves ornamentais, no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, 27:159-67, 1982a.
9. Couceiro, J.N.S.S.; Machado, R.D. & Chaves, J.R.S. - Influenza A, isolamento e caracterização de vírus isolados de aves de vida livre. *An. Microbiol.*, 27:193-204, 1982b.
10. Couceiro, J.N.S.S. - Estudo da ocorrência de infecções por vírus Influenza e da doença de Newcastle numa comunidade de aves ornamentais em cativeiro. Tese de Doutorado apresentada no Instituto de Microbiologia da UFRJ, 1986.
11. Dowdle, W.A.; Kendal, A.P. & Noble, G.R. Influenza viruses. In: Lennette, E.H. & Schmidt, N.J. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 5^a Ed. American Public Health Assoc. Inc., Washington, USA, 1979.
12. Eisa, M. & Omer, E.A. A natural outbreak of Newcastle Disease in pigeon in the Sudan. *Vet. Rec.* 114:297, 1984.
13. Glass, S.E.; Naqi, S.A. & Grumbles, L.C. Isolation of avian Influenza virus in Texas. *Avian Dis.*, 25:545-9, 1981.
14. Halvorson, D.A.; Kelleher, C.J. & Senne, D.A. Epizootiology of avian domestic turkeys in Minnesota. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:914-9, 1985.
15. Hanson, R.P. Newcastle Disease. In: Hofstad, M.S.; Calnek, B.W.; Hemboldt, C.F.; Reid, W.M. & Yoeder, H.W.J. Diseases of poultry. 7th Ed. Iowa State University Press, Iowa, USA, 1978.
16. Hinshaw, V.S.; Bean, W.J.; Webster, R.G. & Siriam, G. Genetic reassortment of Influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. *Virology*, 102:412-9, 1980.
17. Karunakaran, D.; Hinshaw, V.; Poss, P.; Newman, J. & Halvorson, D. Influenza A outbreak in Minnesota turkeys due to subtype H₁₀N₇ and possible transmission by waterfowl. *Avian Dis.*, 27:357-66, 1983.
18. Laver, W.G. & Webster, R.G. Ecology of Influenza viruses in lower mammals and birds. *Brit. Med. Bull.*, 35:29-33, 1979.
19. Luther, P.; Klett, G.E.; Weber, S.; Pechmann, H. & Bergmann, K. The lectin neuraminidase inhibition test: a new method for the detection of antibodies to neuraminidase. *J. Biol. Stand.*, 11:115-21, 1983.
20. Machado, R.D. Góes, P. de; Ono, I.P.C. & Couceiro, J.N.S.S. - Observações virológicas e sorológicas em surto de gripe verificado no Estado da Guanabara. *An. Microbiol.*, 21:47-78, 1974.
21. Majiyagbe, K.A. & Natwathe, D.R. Isolation of virulent Newcastle Disease Virus from apparently normal ducks in Nigeria. *Vet. Rec.*, 108:190, 1981.
22. Matsuoka, Y. Isolation of Influenza viruses and a Paramyxovirus from caged birds. *Jap. J. Vet. Res.*, 27:29, 1979.

23. McNulty, M.S.; Gowans, E.J.; Houston, M.J. & Fraser, G. Neuraminidase content of strains of Newcastle Disease Virus which differ in virulence. *J. Gen. Virol.*, 27:399-402, 1975.
24. Mikami, T.; Izawa, H.; Kodama, H.; Onuma, M.; Sato, A.; Kobayashi, S.; Ishida, M. & Jerome, K. Isolation of Ortho-Paramyxoviruses from migrating feral ducks in Hokkaido. *Arch. Virol.*, 74:211-7, 1982.
25. Paul, J. Cell and tissue culture. 5th Ed. Churchill Livingstone, London, England, 1975.
26. Pensaert, M.; Ottis, K.; Vandeputte, J.; Kaplan, M.M. & Bachmann, P.A. Evidence for the natural transmission of Influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 59:75-8, 1981.
27. Sinnecker, R.; Sinnecker, K.; Zilzke, E. & Köhler, D. Surveillance of pelagic birds for Influenza A viruses. *Acta Virol.*, 27:75-9, 1983.
28. Schild, G.C.; Aymard-Henry, M. & Pereira, H.G. A quantitative single-radial-diffusion test for immunological studies with Influenzavirus. *J. Gen. Virol.*, 16:231-6, 1972.
29. Shortridge, K.F.; Butterfield, W.K.; Webster, R.G. & Campbell, C.H. Diversity of Influenza A virus subtypes isolated from domestic poultry in Hong Kong. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 57:465-9, 1979.
30. Shortridge, K.F. Avian Influenza A viruses of Southern China and Hong Kong: ecological aspects and implications for man. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 60:129-35, 1982.
31. Sever, J.L. Application of a microtechnique to viral and serological investigations. *J. Immunol.*, 88:320-9, 1962.
32. Slemmons, R.D.; Johnson, D.C.; Osborn, J.S. & Hayes, E. Type A Influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. *Avian. Dis.*, 18:119-24, 1974.
33. Stünzner, D.; Thiel, W.; Pötsch, F. & Sixl, W. Isolation of Influenza viruses from exotic and central European birds. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A.*, 274:8-17, 1980.
34. Thorsen, J.; Barker, I.K. & Hinshaw, V.S. Influenza viruses isolated from waterfowl in Southern Ontario, 1976-1978. *Can. J. Microbiol.*, 26:1511-4, 1980.
35. Webster, R.G.; Yakhno, M.; Hinshaw, V.S.; Bean, W.J. & Murti, K.G. Intestinal Influenza replication and characterization of Influenza viruses in ducks. *Virology*, 84:268-78, 1978.
36. Yamane, N.; Odagiri, T.; Arikawa, J. & Ishida, N. Isolation and characterization of Influenza A viruses from wild ducks in Northern Japan. Appearance of Hsw₁ antigens in the Japanese duck population. *Acta. Virol.*, 23:375-84, 1979.
37. Zakstel'skaja, L.J.; Isachenko, V.A.; Osidze, N.G.; Timofeeva, C.C.; Sleouskin, A.N. & Sokolova, N.N. Some observations on the circulation of Influenzavirus in domestic and wild birds. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 47:497-501, 1972.

Errata

Contribuição ao conhecimento da composição antigênica do *Paracoccidioides brasiliensis*, Estudo de 5 amostras. Rev. Microbiol., (S. Paulo), 19(4), p.293-305, 1988.

pag.298. ONDE SE LÊ: Figura 3 - Reação de imunodifusão 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.

LEIA-SE: Figura 3 - Reação de imunodifusão 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 D e lisados à E.

Quando aceitei fazer a revisão deste livro não me lembrei das dificuldades que (alguns de nós) temos com a nomenclatura portuguesa de compostos orgânicos. Por isso, peço desculpas por eventuais anglicismos.

A partir da descoberta do fogo e, principalmente, à medida que nossa civilização se tornou mais industrializada, aumentou significativamente a exposição humana e animal à compostos químicos que causam câncer. Entretanto, somente cerca de 200 anos após a descoberta da carcinogênese química por Sir Percival Pott, reconheceu-se que a elevada incidência de câncer no escrôto de limpadores de chaminés de Londres por ele observada se devia à presença de "benzopirenos" e outros hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) associados à fuligem. Essa dificuldade se deveu, principalmente, ao processo lento de desenvolvimento de ferramentas analíticas adequadas, como a atual cromatografia líquida de alto desempenho/eficiência (CLAD), capaz de separar misturas complexas de uma variedade de isômeros de HPAs, como por exemplo o benzo(a)pireno (BaP), seus isômeros e derivados mutagênicos. Este livro, o primeiro volume da série "Cambridge Monograph on Cancer Research" cobre a química, biologia, análise química e ocorrência do BaP e seu isômero BeP. O capítulo de abertura é dedicado à nomenclatura e uma breve história do benzo(a)pireno desde sua primeira síntese em 1933. O segundo capítulo descreve vários métodos de síntese de derivados do BaP. O terceiro trata de propriedades físicas básicas do BaP, iniciando com métodos de purificação e parâmetros cristalográficos, para em seguida fornecer dados sobre solubilidade e espectros eletrônicos, finalizando com considerações breves sobre aspectos teóricos de relações estrutura-atividade biológica. A química (abreviada) do BaP é discutida em seguida, com a descrição de métodos de deuteração e tritiação, óxido-redução e obtenção de radicais livres. No quinto capítulo são listados os números de registro no Chemical Abstract Service (CAS) de alguns derivados simples do BaP, pontos de fusão, dados de espectros eletrônicos e alguns esquemas de preparação de epóxidos e quinonas. O metabolismo do BaP é discutido em detalhe no sexto capítulo, incluindo mecanismos, métodos de separação e espectros de fluorescência de metabolitos. Os epóxidos dióis são tratados no capítulo seguinte, que sabiamente se inicia com a nomenclatura, seguida da síntese, estrutura, reatividade teórica, hidrólise, reações com outros nucleófilos e ácidos nucleicos. O oitavo capítulo provê um tratamento detalhado da ligação do BaP e seus derivados com proteínas e ácidos nucleicos, incluindo métodos de detecção de BaP ligado ao DNA. Os efeitos de BaP em células *in vitro*, incluindo o teste de Ames e outros sistemas de detecção de mutação, mutagenicidade dos derivados do BaP, toxicidade e reparo do DNA, testes citogenéticos e transformação celular são tratados no nono capítulo. O capítulo dez é dedicado à carcinogênese onde são discutidos os principais métodos de teste de carcinogenicidade, os efeitos agudos e carcinogenicidade de derivativos de BaP, inibidores de carcinogênese, cocarcinógenos, câncer humano e o BaP. O capítulo onze, dedicado ao BeP, inclui síntese, propriedades físicas, aspectos teóricos, química, derivados, metabolismo, ligação ao DNA, mutagenicidade, carcinogenicidade e co-carcinogenicidade. Neste ponto a ênfase do livro volta-se para os problemas analíticos, envolvendo escolha de padrões de referência e aspectos de segurança (capítulo doze), amostragem de material particulado (aerosóis) e amostras aquosas (capítulo treze), extração de benzopirenos de matrizes ambientais (capítulo quatorze), pré-tratamento e concentração através de cromatografias em coluna, em camada delgada, CLAD e permeação de gel (capítulo quinze). O capítulo desseze descreve a separação, detecção, identificação e determinação de benzopirenos por técnicas cromatográficas convencionais, espectrometria de massas e outros métodos espectroscópicos. A ocorrência de benzopirenos no meio ambiente, é tratada, de forma bastante abreviada, apenas no penúltimo capítulo, que inclui concentrações atmosféricas (somente hemisfério norte), na exaustão de veículos automotores e fumaça de cigarro, em alguns produtos industriais, água e sistemas aquosos, alimentos, assuntos estes que deveriam ser descritos no capítulo introdutório. O capítulo final apresenta uma lista útil de referências adicionais, que seria

completa se nela estivessem incluídos três excelentes obras: a clássica "Particulate Polycyclic Organic Matter", do Comitê sobre Efeitos Biológicos de Poluentes Atmosféricos, National Academy Press, Washington, D.C., 1972, "Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluation of Sources and Effects", do Comitê sobre Pireno e Análogos Selecionados, National Academy Press, Washington, D.C., 1983, e "Environmental Carcinogens: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Chemistry, Occurrence, Biochemistry, Carcinogenicity", editado por Gernot Grimmer, CRC Press, Boca Raton, 1983. Os autores estão de parabéns por esta bela obra que certamente não poderá faltar na estante de pesquisadores interessados na mutagênese química e em mecanismos moleculares da carcinogênese.

Antônio H. Miguel
Instituto de Química - USP
Caixa Postal 20780
05508 São Paulo SP

O.L., Kon & Cols., eds. - *Integration and Control of Metabolic Processes: Pure and Applied Aspects*; ICSU Press, Cambridge, UK, 1987. U\$ 59,50

Este volume cobre palestras apresentadas no "4th Federation of Asian and Oceanian Biochemists" e no "Satellite Symposium on Molecular and Protein Engineering", ocorridos em Singapura, em Dezembro, 1986.

Como pode ser inferido pelo próprio título, o livro apresenta tópicos em áreas tão diversas que dificilmente seria de interesse de um pesquisador, ou mesmo de um grupo, adquiri-lo. No entanto, dada a natureza de revisão de vários dos capítulos, escritos por renomados pesquisadores em suas áreas, sua aquisição por bibliotecas seria recomendável. Nota-se como único denominador comum entre os 44 artigos, a aplicação de técnicas de Biologia Molecular nas mais variadas áreas de pesquisa básica e aplicada.

De maior interesse geral, estão os capítulos descrevendo novas tecnologias de análise do DNA e sua expressão e técnicas de engenharia de proteínas. Dentre estes tópicos, podemos destacar alguns artigos: estratégias para macromapeamento de DNA (Cantor, C.R. & Col.), técnicas de marcação por fotoafinidade (Guillory, R.J.); preparação de proteínas em quantidades subnanomoles para microsequenciamento (Simpson, R.J. & Nice, E.C.); estratégias para sequenciamento automatizado de DNA (Nada, A. & Saeda, G.); construção de anticorpos (Mariuzza, R.A.); supressão de codons "âmbar" aplicada à engenharia de proteínas (Miller, J.H. & Col.).

Os demais artigos são divididos nas áreas abaixo relacionadas, dentre os quais cito alguns exemplos:

Estrutura e expressão Gênicas - Estrutura e função do retículo endoplasmático (Hortsch, M. & Col.); regulação da expressão de genes de Herpes simplex-1 (Roizman, B. & Kristie, T.M.).

Moléculas Regulatórias - Inositol fosfolipídeos na transmissão de sinal (Kikkawa, V. & Col.) síntese de neuropeptídeos (Peng Loh, Y.); diferenciação e promoção de tumores por vitamina D (Sude, T. & Kuroki, T.).

Bioquímica do Sistema Imune - Regulação do receptor de interleucina-2 (Masunami, N. & Col.); sinais promovidos por interferon (Tan, Y.H.).

Bioquímica de Macromoléculas - Modelos de processos de transporte (Mitchell, P.); Z DNA e proteínas que se ligam à ele (Rich, A.).

Bioquímica Marinha e de Plantas - Polipeptídeos anticongelantes (Hew, C.L. & Col.); mecanismo de senescência de folhas (Thimann, K.V.).

Bioquímica Clínica - Drogas anticâncer com ação sobre DNA topoisomerase (Ralph,

R.K. & Scheneider, E.); estudos moleculares de doenças genéticas (RFLP) (Tam, J.W.O. & Lam, V.M.S.).

Em resumo, este volume apresenta áreas de pesquisa de rápido desenvolvimento de forma bastante adequada para não especialistas das áreas específicas, promovendo uma visão ampla das aplicações das técnicas de Biologia Molecular nos vários campos de pesquisa básica ou aplicada.

Beatriz A. Castilho Valavicius
Instituto de Ciências Biomédicas - USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 São Paulo SP

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

VOLUME 19 JANEIRO-MARÇO 1988 NÚMERO 1

CONTEÚDO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

14 *Pseudomonas aeruginosa*
como agente de
encefalite em suínos

Pseudomonas aeruginosa
as agent of swine
encephalite

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

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

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

Campos, C.E.O.P. de; Filho, E.P. de C.; & Campos, E.P. de	22	Estudo comparativo de duas novas cefalosporinas com outras drogas antimicrobianas frente a bastonetes Gram negativos	Comparative studies of two cephalosporins with other antimicrobial drugs against Gram negative rods
Franco, B.D.G. de M.; & Nielsen, E.M.F.	27	Avaliação de um teste rápido de aglutinação em lâminas para identificação de culturas de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas de alimentos	Evaluation of a rapid slide agglutination test for the identification of <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from foods
Martins, M.T.; Pessoa, G.V.A.; Sanchez, P.S.; Sato, M.I.Z.; Monteiro, C.K.; Coimbrão, C.A.; Marques, E.; & Irino, K.	29	Isolamento de <i>Salmonella</i> no ambiente aquático: significado sanitário	Isolation of <i>Salmonella</i> from aquatic environment: Sanitary significance
Júnior, J.P. de S.; Lemos, M.V.F.; & Azevedo, J.L. de	40	Eliminação de um plasmídio de <i>Staphylococcus aureus</i> pela 8-metoxipsoralen plus associada à luz UV longa	Elimination of a <i>Staphylococcus aureus</i> plasmid by 8-methoxysoralen plus near UV light*
Lang, D.; Siqueira, L.F. de G.; Belda, W.; Júnior, M.F.Q. dos S.; Silveira, M.C.; & Francisco, W.	42	Go-slideR como meio de transporte. Avaliação técnica	Go-slide as a transport medium. Technical evaluation
Timenetsky, J.; & Alterthum, F.	46	Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes domésticos	Determination of antimicrobial activity of domestic disinfectants
Kilikian, B.V.; Kahvedjian, M.; & Netto, W.S.	52	Influência do cálcio na estabilidade de α -amilase bacteriana	Influence of calcium on the thermal stability of bacterial α -amylase
Avila-Campos, M.J.; Souza, E.C. de; Farias, L. de M.; Carvalho, M.A.R. de; Damasceno, C.A.V.; & Cisalpino, E.O.	56	Adequação metodológica para testes de susceptibilidade de <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> a drogas antimicrobianas	Methodological adequacy for susceptibility test of <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> to antimicrobial drugs*

Scotti, M.R.; Sá, N.M.H. de; Vargas, M.A.T.; & Dobereiner, J.	60 Avaliação da resistência à tetraciclina, kanamicina, cloranfenicol de estirpes de <i>Bradyrhizodium</i> <i>japonicum</i> e <i>Bradyrhizobium de</i> <i>stylosanthes</i> isoladas de solo de cerrados	Evaluation for tetracycline, kanamycin and chloranphenicol resistance of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> and <i>Bradyrhizobium</i> of <i>Stylosanthes</i> isolated from cerrado soils
Costa, J.L. da S.; Kushalappa, A.C.; & Alfenas, A.C.	67 Efeito de extratos proteicos de milho sobre a produção de aflatoxina B	Effect of corn proteic extracts on aflatoxin B production
Schmidell, W.; Facciotti, M.C.R.; Kilikian, B.V.; Abouthoul, H.; & Aguero, J.M.Z.	71 Influência da oscilação do pH na síntese de amiloglicosidase por <i>Aspergillus awamori</i>	Influence of pH oscillations in amylglucosidase production by <i>Aspergillus awamori</i>
Neirotti, E.; & Azevedo, J.L.	78 Técnica semiquantitativa de avaliação da produção de celulases em <i>Humicola</i> <i>sp</i>	Semiquantitative method to evaluate cellulases production in <i>Humicola</i> <i>sp</i>
Higuchi, T.; Ogata, H.; Veiga, S.S.; Nogueira, Z.M.; & Felippe, J.M.M. de S.	82 Purificação da imunoglobulina (IgG) de coelho, obtenção de soro de carneiro Anti-IgG de coelho e aplicação em radioimunoensaio de p15 do vírus da leucose de aves.	Purification of rabbit IgG, obtention of sheep antirabbit IgG and their use in radioimmunoassay of avian leukosis virus-p15
Informação Técnico-Científica SBM	89	

VOLUME 19 ABRIL-JUNHO 1988 NÚMERO 2

	CONTEÚDO	CONTENTS
Teixeira, L.M. Andrade, J.R.C. & Lourenço N.J.	93 Sorotipos susceptibilidade antimicrobianos amostras de <i>Streptococcus</i> <i>pneumoniae</i> isoladas no Rio de Janeiro, Brasil	e a de no and of of in Brazil
Velazco, C. Teixeira, L.M. & Benchetrit, L.C.	100 Produção de β-lactamase por estafilococos coagulase-negativos susceptibilidade antimicrobianos β-lactâmicos	e a and to of by and to of

Hofer, E. & Oliveira, L.M.A.	109	Sensibilidade antimicrobiana em amostras de <i>Listeria</i> isoladas de diferentes fontes e regiões do Brasil	Antimicrobial susceptibilities of <i>Listeria</i> strains isolated from different sources and areas in Brazil
Tortora J.C.de O. & Zebral, A.A.	113	Um surto de toxinfecção alimentar humana, no Rio de Janeiro, causado por chouriço contaminado com <i>Clostridium perfringens</i> enterotoxigênico tipo A	A human food poisoning outbreak in Rio de Janeiro caused by sausage contaminated with enterotoxigenic <i>Clostridium perfringens</i> type A
Araújo, M.L.C.de Cardoso, M.S. Santiago, M.E.B. Andrioli, J.L. & Ito, I.I.	119	<i>Staphylococcus aureus</i> : Fagotipagem de amostras de portadores bovinos em lactação	<i>Staphylococcus aureus</i> : phage typing in samples of bovine carriers in lactation period
Watanabe, D.S.A. Decarlis, R.M.S.T. Michelin, L.A. & Montelli, A.C.	123	Fatores de virulência de amostras urinárias de <i>Escherichia coli</i>	Virulence factors of urinary <i>Escherichia coli</i> strains
Blanco, S.E. Kavka, J. Pappano, N.B. Debattista, N.B. Segovia, R.F. & Ferretti, F.H.	129	Actividad bacteriostatica de 2',4'-dihidroxi-3'-metoxichalcone	Bacteriostatic activity of 2',4'-dihydroxy-3'-methoxychalcone
Lacerda, M.D. Pontes, J.D'.C. & Hofer, E.	135	Circulação de enterobactérias patogênicas em menores institucionalizados: II - Estudo bacteriológico	Circulation flow of enteropathogenic bacteria in institutional children: II - Bacteriologic study
Soares, L.A.	141	Resistência a amikacina e sisomicina em bacilos Gram-negativos e estafilococos	Resistance to amikacin and sisomicin in Gram-negative bacilli and staphylococci
Tortora, J.C.de O. & Oliveira, S.S.de	146	Uso da enterotoxina parcialmente purificada para a obtenção de antissoro visando o diagnóstico das toxinfecções alimentares por <i>Clostridium perfringens</i>	Use of partially purified enterotoxin to obtain antiserum for diagnosis of <i>Clostridium perfringens</i> food poisoning
Mathias, L.A. Pinto, A.A. Girio, R.J.S. & Perecin, D.	148	Uso da reação de fixação de complemento na diferenciação entre infecção experimental por <i>Brucella abortus</i> e por <i>Yersinia enterocolitica</i> sorogrupo 09 em bovinos	Use of complement fixation test in the differentiation of <i>Brucella abortus</i> and <i>Yersinia enterocolitica</i> serogroup 09 experimental infection in bovine

Filho, P.P.G.	155	Análise crítica da Portaria nº 67 (1985) do Ministério da Saúde que estabelece normas para registros de saneantes domissanitários, com ação antimicrobiana, no tocante aos produtos de uso hospitalar: Proposta alternativa	Critical approach of the Act 67 from the Brazilian Health Ministry which establish guidelines for the registration of hospital disinfectant and sanitizer products: alternative proposal
Linardi, V.R. Leão, S.F. Carvalho, C.T. & Cerqueira, D.A.	159	Estudo de fatores que inibem o crescimento de ferrobactérias em poços	Study of factors that inhibit the growth of iron bacteria in wells
Purchio, A. Gambale, W. & Paula, C.R.	166	Fungos filamentosos em águas litorâneas da Baixada Santista (Estado de São Paulo - Brasil)	Molds from some beaches in the southern area of São Paulo State (Baixada Santista), Brazil
Purchio, A. Gambale, W. Paula, C.R. Barbieri, W. Sabino, M. Meireles, M.C.A. & Iida, S.	172	Micotoxinas (aflatoxinas, patulina, ochratoxina A e sterigmatocistina) e correspondentes fungos micotoxigenicos em ração destinadas ao gado leiteiro	Survey of mycotoxins (aflatoxins, patulin, ochratoxin and sterigmatocystin) and correlate fungi in dairy cattle feedstuffs
Araújo, C.C.de Paula, M.de Q. Maia, R.F. & Lima, E.de O.	177	Avaliação da atividade antimicrobiana do composto 5,7,2',5'-tetraacetoxi-4'-fenilcumarina obtido a partir de <i>Coutarea hexandra</i> (Rubiaceae)	Antimicrobial activity evaluation of 5,7,2',5'-tetraacetoxi-4'-phenilcoumarin
Perez, J.N. Reis, L.F.L. Contijo, J.G. Queiroz, D.M.de M. Mendes, E.N. & Penna, F.J.	180	Participação de rotavírus e adenovírus na diarréia aguda da infância, em Belo Horizonte	Occurrence of rotavirus and adenovirus in children with acute diarrhoea in Belo Horizonte
Vicente, M. Fazio, G.De & Golgher, R.R.	184	Efeito Inibidor do interferon de amnio humano (Hu Am IFN) sobre quatro vírus de plantas	Inhibitory effect of human amniotic interferon in four plant virus systems
Novo, M.A.da S. & Golgher, R.R.	190	Produção de interferon por placenta humana	Production of interferon by the human placenta
Ribeiro, J.C.C. Guimarães, W.V. Borges, A.C. Silva, D.O. & Cruz, C.D.	196	Produção de levana e etanol por mutantes de <i>Zymomonas mobilis</i> CP4 durante a fermentação de sacarose	Levan and ethanol production by <i>Zymomonas mobilis</i> CP4 mutants sucrose fermentation

Breda, M.* & Ioneda, T.	202	Produção de glicolipídios por <i>Rhodococcus rhodochrous</i> cultivado em galactose	Production of glycolipids by <i>Rhodococcus rhodochrous</i> grown on galactose
Takaki, M. Jordão, L.R. & Lopes, V.B.	207	Projeto de agitador de cultura líquida	Design of a liquid culture rotator
Informação Técnico-Científica SBM	210		

VOLUME 19 JULHO-SETEMBRO 1988 NÚMERO 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	
Cáceres, O.; & Vieira, A.A.H.	223	Alguns aspectos do crescimento de <i>Microcystis aeruginosa</i> Kuetz. emend. Elenkin in ASM-1 medium	Some features on the growth of <i>Microcystis aeruginosa</i> Kuetz. emend. Elenkin in ASM-1 medium
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	Microflora in corn (<i>Zea mays</i>) crop, Red-Yellow Latosol sand phase, treated with vinasse in Rio Claro, State of São Paulo, Brazil
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	Comparative evaluation of the Staphy-Test and the tube coagulase test for the identification of pathogenic Staphylococci from animal sources
Queiroz, D.M. de M.; & Mendes, E.N.	241	Estudo bacteriológico semi-quantitativo de pontas de catéteres endovenosos	Semiquantitative culture of intravenous catheters
Lacerda, M.D.; Pontes, J.D.C; & Hofer, E.	247	Circulação de enterobactérias patogênicas em menores institucionalizados: III - Estudo sorológico	Circulation flow of enteropathogenic bacteria in institutional children. III - Serologic study

Mortatti, M. da P.L.; & Park, Y.K.	253	Estudo comparativo da fermentação de glicose e sacarose por <i>Zymomonas mobilis</i>	Comparative fermentation of glucose and sucrose by <i>Zymomonas mobilis</i>
Nascimento, D. do; Sabioni, J.C.; & 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.P. de; Damasceno, C.A.V.; & Cisalpino, E.O.	262	Atividade hemolítica de <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Hemolytic activity of <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>
Araújo, F.L. de; & Ricciardi, I.D.	266	Atividade biológica do lipopolissacarídeo (LPS) de <i>Moraxella bovis</i>	-
Maugeri Fº, F.; & Goma, G.	271	Degradação termofílica de celulose com <i>Clostridium thermocellum</i>	Thermophilic degradation of cellulose by <i>Clostridium thermocellum</i>
Penha, E. das M.; Rosenberg, 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 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 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-Paracoccidioides brasiliensis	
Paula, C.R.; Gambale, W.; Iaria, S.T.; & Reis F?, S.A.	317	Ocorrência de fungos em manteigas oferecidas ao consumo público no Município de São Paulo	Occurence 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 rotavirus 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 in vitro 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		

VOLUME 19 OUTUBRO-DEZEMBRO 1988 NÚMERO 4

		CONTEÚDO	CONTENTS
Crapez, M.A.C.; Tosta, Z.T.; & Lacerda, T.P.	347	Caracterização fenotípica de estírelas de <i>Bacillus circulans</i> pertencentes a American type culture collection (ATCC)	Phenotypic characterization of <i>Bacillus circulans</i> of the american type culture collection (ATCC)
Leite, C.Q.F.; Giannini, M.J.S.M.; & Falcão D.P.	354	Presença de <i>Mycobacterium marinum</i> e outras micobactérias oportunistas em águas de piscinas em Araraquara, SP	Presence of <i>Mycobacterium marinum</i> and other opportunist mycobacteria in swimming pool waters in Araraquara, SP
Ideal, N.C.; Cavalcanti, T.I.R.; Costa, M.F.da; Rodrigues, D.dos P.; & Hofer, E.	360	Avaliação de dois meios de transporte no isolamento de enterobactérias patogênicas	Comparison of some transport culture media for pathogenic enterobacteria

Barbosa, H.R.; & Carvalhal, M.L.C.	365	Isolamento e caracterização morfo-fisiológica de bactérias fixadoras de nitrogênio aeróbias, de vida livre, de solo de cerrado	Morfo-physiological aspects of free-living bacteria isolated from soil under cerrado
Nader Fº, A.; Rossi Jr, O.D.; & Schocken-Iturrino, R.P.	369	Pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> enterotoxigenicos em leite de vacas com mastite subclínica	Research of enterotoxigenic <i>Staphylococcus aureus</i> in milk from subclinical mastitic cows
Johnson, E.H.; Vidal, C.E.S.; & Rosa, J.S.	374	Comparação de uma difusão em Gel-Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Dig-ELISA) com o Ensaio de Inibição de Hemólise Sinergico para registrar a resposta humoral de caprinos a exotoxina de <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	Comparison of a diffusion in gel-enzyme linked immunosorbent assay (Dig-Elisa) and the synergistic hemolysis inhibition assay to record the antibody response of goats to the exotoxin of <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
Cunha, R.A.F.da; & Takei, K.	379	<i>Mycoplasma hominis</i> e <i>Ureaplasma urealyticum</i> : Pesquisa no material cervical de gestantes	<i>Mycoplasma hominis</i> and <i>Ureaplasma urealyticum</i> : research in pregnants cervical mucus specimens
Cardoso, C.L.; Teixeira, L.M.; Contijo Fº, P.P.	385	Susceptibilidade a antimicrobianos e fagotipagem de amostras hospitalares e não hospitalares de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina, isoladas das mãos	Antimicrobial susceptibilities and phage typing of Hospital and non-hospital strains of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from hands
Sabioni, N.S.S.; Pinheiro, A.J.R.; & Teixeira, M.A.	393	Leite acidófilo: Isolamento e caracterização de <i>Lactobacillus acidophilus</i> de fezes de crianças alimentadas ao seio e de bezerros	Acidophilus Milk: Isolation and characterization of <i>Lactobacillus acidophilus</i> from breast-fed children and from young calves feces
Genovez, M.E.; & Yasuda, P.H.	399	Avaliação da eficiência de estírces de <i>Leptospira biflexa</i> no diagnóstico sorológico de triagem da Leptospirose animal	Efficiency evaluation of <i>Leptospira</i> strains on screening serological diagnosis of the animal leptospirosis

Girio, R.J.S.; Mathias, L.A.; Yanaguita, R.M.; & Mano Fº, A.C.	406	Evolução dos títulos de anticorpos séricos em búfalos jovens infectados experimentalmente em <i>Leptospira interrogans</i> sorotípo pomona	<i>Evolution of antibody titres in sera of young water buffaloes experimentally infected with Leptospira interrogans serovar pomona</i>
Duarte, M. do R.	412	Resistência a antimicrobianos e produção de colicinas em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de urina e fezes	<i>Drug resistance and colicin production in Escherichia coli isolated from urine and faeces</i>
Campos-Takaki, G.M.de; & Beakes, G.W.	418	Condições culturais e desenvolvimento de <i>Ellisomyces anomalus</i>	<i>Cultural conditions and development of Ellisomyces anomalus</i>
Ashcar, H.; Paula, C.R.; & Petrocini, V.R.	422	Manutenção de fungos por processo de lyofilização após período prolongado de tempo - 34 anos	<i>Maintenance of fungi by lyophilization (Observation after 34 years)</i>
Lambais, M.R.	425	Descoloração microbiológica do efluente de uma indústria de celulose branqueada	<i>Biodecolorization of the effluent of a bleached pulp plant</i>
Leite, S.G.F.; França, F.P.de	430	Estudo preliminar do efeito da adição de etanol na fermentação alcóolica desenvolvida por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> F1	
Dias, J.L.C.; Coutinho, S.D.; Costa, E.O.da; Carvalho, V.M.da; Matushima, E.R.; Sinhorini, I.L.; & Gaviolle, M.C.	432	Surto de saprolegnose em girinos (<i>Rana catesbeiana</i>)	<i>Saprolegniosis outbreak in tadpoles (<i>Rana catesbeiana</i>)</i>
Goldman, G.H.; Fungaro, M.H.P.; & Azevedo, J.L.de	438	Avaliação da atividade celulótica de algumas linhagens do grupo <i>Aspergillus niger</i>	<i>The evaluation of the cellulolytic activit in some strains of Aspergillus niger group</i>
Shimizu, M.T.	442	Enzimas histolíticas produzidas por leveduras do gênero <i>Candida</i>	<i>Hystolitic enzymes produced by yeasts of genus Candida</i>

Maugeri Fº, F.; & Goma, G.	446	Produção de proteína de organismos unicelulares a partir de ácidos orgânicos com <i>Candida</i> <i>utilis</i>	SCP production from organic acids with <i>Candida utilis</i>
Couceiro, J.N.dos S.S.; Machado, R.D.; Couceiro, E.dos S.S.; & Cabral, M.C.	453		<i>Study of an ornamental bird flock over a period of three years: Incidence of avian influenza viruses</i>
Informação Técnico-Científica SBM	460		

Impresso em offset

