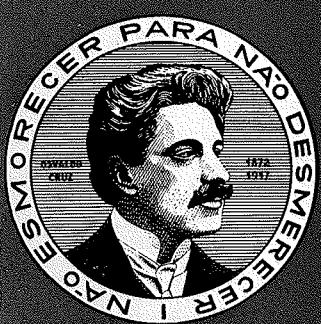


Vol. 2, n.º 2, p. 63-105

1971

REVISTA  
DE  
**MICROBIOLOGIA**



Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia  
São Paulo - Brasil



## C O N T E Ú D O

	Pág.
<b>EDITORIAL</b>	
O que é um microbiologista? — P. de GÓES .....	63
<b>ARTIGOS ORIGINAIS</b>	
Pesquisa da tetratrationato-redutase (TTR) em culturas de <i>Salmonella typhi</i> — E. HOFER & Y. P. S. da SILVA .....	65
Contaminacão do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo <i>Clostridium tetani</i> . II. Avaliação da ocorrência estacional do bacilo do tétano no solo — W. TAVARES, R. A. SEBA & J. R. COURRA .....	69
Freqüência e identificação do <i>Haemophilus vaginalis</i> isolado de vaginites — M. MAGALHÃES & A. VÉRAS .....	73
The influence of oxygen on the resistance of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> to streptomycin — S. A. C. CAMBA, F. ALTERTHUM & L. P. de CARVALHO LIMA .....	79
Anti-rabies revaccination in humans. I. Effect of different schedules on individuals previously vaccinated with 14 or more doses — O. A. C. PEREIRA, N. COUTINHO, T. RAPHAELIAN & A. GODANO .....	83
A comparison between the Löwenstein-Jensen and American Trudeau Society culture media for isolation of tubercle bacilli in pathological specimens negative to microscopic examination — E. WAISBICH, L. R. V. FERNANDES & A. L. R. ROSSI .....	87
Resistência do <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> , "in vitro", à anfotericina B — A. L. CASTRILLON & P. S. MINAMI .....	93
<b>REVISÃO</b>	
Biosynthesis of the side chain portion of <i>Salmonella typhimurium</i> "O" antigen — T. IGUCHI .....	97

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

*Sócios Patrocinadores*

ADAGA S.A. — COMÉRCIO E IMPORTAÇÃO

BIOLAB — PRODUTOS BIOLÓGICOS PARA LABORATÓRIOS LTDA.

CELM — COMPANHIA EQUIPADORA DE LABORATÓRIOS MODERNOS

DIEDERICHSEN THEODOR WILLE — COMÉRCIO INDÚSTRIA S.A.

ELI LILLY DO BRASIL LTDA.

INDÚSTRIAS FARMACÊUTICAS FONTOURA WYETH S.A.

INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA SCHERING S.A.

LABORTERÁPIA BRISTOL S.A. INDÚSTRIA QUÍMICA E FARMACÊUTICA

LABORATÓRIO ROCHE — PRODUTOS QUÍMICOS E FARMACÊUTICOS

MICRONAL S.A. — APARELHOS DE PRECISÃO

Pfizer QUÍMICA LTDA.

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A Revista de Microbiologia é uma publicação oficial da Sociedade Brasileira de Microbiologia. Publica trabalhos originais e de revisão em todos os campos da Microbiologia e da Protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do corpo editorial.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e cópia) a L. R. Trabulsi, Escola Paulista de Medicina, rua Botucatu, 862, Caixa Postal 20.342, São Paulo, S. P., Brasil ou a Italo Suassuna, Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Pasteur 250, fundos, Rio de Janeiro, GB, Brasil.

**NORMAS GERAIS** — Todo manuscrito apresentado à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os manuscritos podem ser redigidos em português, inglês ou espanhol. Uma vez aceitos pela Revista não poderão ser reproduzidos, mesmo em parte, sem consentimento oficial dos editores.

O estilo editorial da Revista segue essencialmente o *Style Manual for Biological Journals* (2.ª ed., AIBS, 1964). Os símbolos genéticos deverão seguir essencialmente as recomendações de DEMEREC et al. (*Genetics*, 54:61, 1966). Abreviaturas bioquímicas devem seguir essencialmente as regras da IUPAC-IUB (*J. Biol. Chem.* 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (*Enzyme Nomenclature*, Elsevier Publishing Co., 1965). Para expressar comprimentos, pesos e volumes, os prefixos nano (n) e pico (p) devem ser usados em lugar de milímicro ( $m_\mu$ ) e micromicro ( $\mu\mu$ ). Comprimentos devem ser expressos em nanômetros (nm;  $10^{-9}$  m) ou em micrômetros ( $\mu m$ ;  $10^{-6}$  m), ou ainda, em Angstroms (A;  $10^{-10}$  m). Partes por milhão (ppm), devem ser expressas como microgramos por mililitros ( $\mu g/ml$ ), ou microlitros por litro ( $\mu$  litros/litro). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

**NOMENCLATURA DOS MICRORGANISMOS** — A combinação binária, nome do gênero seguido do nome da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (7.ª ed., 1957) obedecida. Se um Autor divergir dessa nomenclatura, seu próprio julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente do Manual de Bergey deve ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo. Quando um novo nome fôr proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

**FORMA DO MANUSCRITO** — Os manuscritos devem ser datilografados em papel branco comum, tipo ofício, em espaço duplo ou triplo, com margens laterais, superior e inferior de, no mínimo, 3 centímetros. Devem, ainda, ser divididos nas seguintes seções: Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências bibliográficas.

**RESUMO** — Todo trabalho deve se iniciar com um resumo que não deve exceder a 250 palavras. Além destes, os redigidos em inglês devem ser acompanhados de um resumo em português e os redigidos em português e espanhol de um resumo em inglês. Estes resumos devem incluir o título do trabalho.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** — No texto, as referências são citadas por número. A seção de Referências Bibliográficas deverá ser apresentada em ordem alfabética, pelo primeiro Autor, e numerada. Os nomes das publicações científicas são abreviados de conformidade com a lista de periódicos resumida pelos *World Medical Periodicals*. Citações de resumos, "dados não publicados", "comunicações pessoais" e "no prelo", não serão aceitas como referências bibliográficas.

**TABELAS** — Cada tabela deve ser datilografada numa página separada. Os dados devem ser arranjados de maneira a que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Os cabeçalhos devem ser suficientemente claros de maneira a que os dados sejam compreensíveis sem necessidade de consulta ao texto. Notas explanativas de rodapé são permitidas, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados na obtenção dos dados relatados devem ser mencionados exclusivamente na seção correspondente.

**ILUSTRAÇÕES** — Um conjunto completo de figuras, preferivelmente como fotografias, deve acompanhar cada uma das duas vias do manuscrito. Os gráficos devem ser desenhos concluídos e que não requeiram qualquer montagem ou re-arranjo. Parte alguma de um gráfico poderá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo (exceto a legenda, que deve constar em página separada). A maioria dos gráficos será reduzida à largura de cerca de 13 centímetros e todos os elementos no desenho devem ser previstos para essa escala de redução. A legenda da figura deve proporcionar informação suficiente para que a figura seja compreensível sem consulta ao texto. Detalhes experimentais não devem ser repetidos nas legendas das figuras.

**NOTAS PRÉVIAS** — Não devem exceder de 500 palavras e o respectivo resumo, de 25 palavras. Os Autores devem consultar um número da Revista para se familiarizarem com a forma e o estilo.

**SEPARATAS** — Os Autores terão direito a 10 separatas; devem entrar em entendimento com os Editores da Revista quando desejarem maior número, correndo então as despesas por conta própria.

## REVISTA DE MICROBIOLOGIA

### AQUISIÇÃO POR NÃO-MEMBROS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

A Revista de Microbiologia é órgão da Sociedade Brasileira de Microbiologia, sendo publicada trimestralmente. Teve início em julho-setembro de 1970.

#### P R E C O S

Cada exemplar .....	Cr\$ 10,00
Número atrasado .....	Cr\$ 15,00
Assinatura anual .....	Cr\$ 40,00
Assinatura para o Exterior Marítimo .....	US\$ 10,00
Assinatura para o Exterior Aéreo .....	US\$ 15,00

Ordens de pagamento e requisição de números atrasados deverão ser feitas para:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA  
Escola Paulista de Medicina  
Rua Botucatu, 862 — C.P. 20.342  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia  
SÃO PAULO — BRASIL

---

## REVISTA DE MICROBIOLOGIA

### SUBSCRIPTION BY NON-MEMBERS OF THE SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

The Revista de Microbiologia is a quarterly publication, sponsored by the Sociedade Brasileira de Microbiologia. Its first number was published on July-September, 1970.

#### P R I C E S

Single copies .....	US\$ 2,00
Back copies .....	US\$ 3,00
Foreign countries subscription (Second class postage)	US\$ 10,00
Foreign countries subscription (Air mail) .....	US\$ 15,00

Orders and enquiries about back volumes should be sent to:

REVISTA DE MICROBIOLOGIA  
Escola Paulista de Medicina  
Rua Botucatu, 862 — C.P. 20.342  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia  
SÃO PAULO — BRASIL

## EDITORIAL

### O QUE É UM MICROBIOLOGISTA?

Paulo de GÓES<sup>(1)</sup>

É muito difícil, hoje em dia, definir-se o que é um microbiologista. Ponto de encontro de especialistas os mais diversos, é a Microbiologia praticada por cientistas de outros campos, sobretudo por bioquímicos e geneticistas.

Isto decorre da circunstância de serem os microrganismos "animais de laboratório" por excelência, pois, usando-os como tal, é que têm surgido as descobertas mais revolucionárias e os maiores avanços nos campos da bioquímica, genética e biologia molecular.

Foi também através de estudos com microrganismos que surgiu esse fabuloso contingente de conhecimentos modernos sobre a glamorosa Biologia Molecular, tão em moda como a midi — ou a maxi-saia. É o figurino atual, como as criações de Patom ou Lanvin. Aí surgiu uma nova nomenclatura esotérica e torrencial que às vezes, confunde o microbiologista do modelo tradicional, como eu e tantos outros aqui presentes, mais ungidos à Microbiologia aplicada, como a que faço e sempre fiz e que entendo ter ainda razão de ser cultivada.

Neste particular, ou seja, a orientação a ser seguida na pesquisa e ensino da Microbiologia, como um pêndulo, as tendências têm oscilado para posições extremas, sem que se estabeleça um justo equilíbrio. Uns enfatizando a maior importância da investigação e ensino no campo básico ou fundamental, outros reclamando maior interesse para pesquisa aplicada.

Ainda recentemente, este foi um dos pontos mais debatidos em uma conferência promovida pela "American Academy of Microbiology" sobre ensino, realizada em 1967, em Chicago, e um dos defensores daquela última referida posição alegava que a especialização chegou a tal exagero que já há alguns microbiologistas que são Kreb-ciclistas, outros pentose-shuntistas, para não esquecer os que são ciclistas dicarboxílicos.

Voltando ainda a falar sobre *quando* começar o ensino da Microbiologia, devo dizer que, para a descoberta e a captação de talentos, deve ele começar o mais precocemente nos cursos superiores em que exista a disciplina. Na Universidade, tal estratégia deverá ser praticada em todos outros cursos de ciências exatas, além dos de Biologia, abrangendo, particularmente, aqueles para a formação dos profissionais da saúde. Esse ensino deverá prosseguir após a graduação, sob a forma de cursos de especialização, aperfeiçoamento, atualização e, seguindo-se a estes, os de pós-graduação, ou seja, de mestrado ou doutorado. Só dessa forma é que se poderá recrutar os elementos mais bem dotados dentre aqueles que fizeram os referidos cursos para graduados. Dêstes últimos é que surgirão os pes-

Excerto de conferência no encerramento do II Congresso Brasileiro de Microbiologia,  
São Paulo, julho de 1970

(1) Professor-Titular de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

quisadores e os professores de que somos muito carentes. A propósito, devo acen-tuar que não podemos dar-nos ao luxo de termos profissionais sómente votados à pesquisa, sem ensinar, pois, segundo preceitua a legislação vigente, pesquisa e ensino são atividades indissociáveis.

Para tanto, não basta conhecer bem a especialidade. É preciso também saber *como* ensinar. Já está superada a época em que se dizia que o ser professor era uma qualidade inata. Com os recursos modernos da pedagogia em ensino superior, das estratégias e metodologias e recursos da tecnologia educacionais, baseadas, sobretudo, no processo mais da aprendizagem do que do ensino — como dizem os norte-americanos — “more learning, less teaching” — podemos dotar indivíduos, supostamente sem vocação didática, de grande poder de comunicação.

Por final, não poderia deixar, ao expôr essas idéias gerais, de enfatizar a importância que a Microbiologia assumiu, abrangente que é de todos os campos de conhecimentos. Isto porque, se os micróbios são hoje em dia, como já referi, os melhores instrumentos para investigação em bioquímica, genética e biologia molecular, são também as ferramentas fundamentais para a criação de riquezas. A primeira delas é a que resulta na melhoria das condições da vida humana e dos animais, que servem ou são fontes de alimentos ou produtos úteis ao homem; lembre-se que a produtividade agrícola repousa no conhecimento adequado da Microbiologia do Solo; que vários produtos úteis são obtidos por via de fermentação, tais como as proteínas, capazes de resolver o problema pandêmico da fome.

## PESQUISA DA TETRATIONATO-REDUTASE (TTR) EM CULTURAS DE *SALMONELLA TYPHI*

Ernesto HOFER<sup>(1)</sup> & Yara Pereira Simoni da SILVA<sup>(1)</sup>

### RESUMO

Foi estudada a distribuição da tetrationato-redutase em cerca de 648 amostras de *Salmonella typhi*, isoladas em diferentes estados do Brasil.

O resultado demonstrou a predominância de amostras TTR+ (94,90%), encontrando-se porém em algumas regiões, um apreciável número de reações negativas, quando se estabeleceu uma comparação com a média obtida (5,09%).

É enfatizada a necessidade de que esta prova seja empregada rotineiramente nos laboratórios de Saúde Pública, aliada à determinação dos tipos bioquímicos, segundo Kristensen, com a finalidade precípua de firmar uma distribuição epidemiológica regional das amostras de *S. typhi*.

### INTRODUÇÃO

A utilização do caldo tetrationato de MULLER<sup>6</sup>, como meio de enriquecimento para a maioria das salmonelas, recebeu as primeiras atenções, quanto ao seu mecanismo de ação, a partir dos trabalhos de KNOX & col.<sup>3</sup>. Observaram êstes que certas amostras dos gêneros *Salmonella* e *Proteus* apresentavam a capacidade de reduzir rapidamente o tetrationato a tiosulfato, ao passo que outras bactérias, principalmente pertencentes aos gêneros *Escherichia* e *Shigella*, foram incapazes de efetuar tal redução. Sugeriram os Autores supracitados, uma hipótese para explicar tal fenômeno: o tetrationato funcionaria como uma fonte adicional de energia em condições de relativa anaerobiose e sómente seria utilizável por aqueles microrganismos redutores deste substrato. Posteriormente, KNOX<sup>2</sup> veio confirmar a hipótese emitida, caracterizando ainda a natureza enzimática desse processo.

Baseados nos trabalhos anteriores, PICHINOTY & BIGLIARDI-ROUVIER<sup>9</sup> desenvolveram uma técnica específica e simples, capaz de revelar a intensidade de redução do tenerationato a tiosulfato, a qual, posteriormente, LE MINOR & PICHINOTY<sup>5</sup> introduziram como mais um elemento nas provas de rotina,

fundamentados na observação dos resultados obtidos em um levantamento entre as várias espécies bacterianas anaeróbias facultativas. Destacam sua importância taxonômica entre as enterobactérias, principalmente quanto às salmonelas.

NICOLLE & LE MINOR<sup>7</sup>, estudando a presença ou ausência da tenerationato-redutase em 1978 amostras de *Salmonella typhi*, oriundas dos mais diferentes pontos do mundo, verificaram uma certa distribuição regional no percentual de reações positivas de interesse prático em estudos epidemiológicos. LE MINOR<sup>4</sup>, investigando a tenerationato-redutase em cerca de 8001 culturas de salmonelas, representando 262 tipos sorológicos diferentes, obteve 96,36% de reações positivas e apenas 3,64% negativas. Destaca a importância epidemiológica em determinados sorotipos, compreendendo amostras TTR+ e TTR-, tais como *S. typhi*, *S. paratyphi A*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. gallinarum* e *S. pullorum*.

No presente trabalho, foi pesquisado o comportamento de 648 amostras de bacilo tífico, oriundas de diferentes áreas do Brasil, no que tange à presença ou ausência da tenerationato-redutase.

(1) Departamento de Microbiologia do Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, Brasil

## MATERIAL E MÉTODOS

Para a determinação da tetrationato-redutase, utilizamos a técnica descrita por LE MINOR & PICHINOTY<sup>5</sup>, esquematizando-as seguintes etapas:

I — Meio básico — Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 3,575 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,98 g; MgSO<sub>4</sub>: 0,3 g; NH<sub>4</sub>Cl: 0,5 g; FeSO<sub>4</sub> e CaCl<sub>2</sub>: 0,001 g; Extrato de levedo (BBL): 0,25 g; Bacto-Peptone: 0,25 g; Água destilada: 100,0 ml. O pH deverá ser ajustado a 7,0 e o meio distribuído em volumes de 10,0 ml, em tubos de 17,0 × 170,0 mm. A esterilização é feita por autoclavagem a 120°C, durante 20 minutos.

II — Adicionar aos tubos contendo o meio básico esterilizado, 0,2 ml de uma mistura em partes iguais das soluções de glicose a 20,0% e tetrationato de potássio a 10,0% (esterilizadas por filtração em Seitz). A semeadura é efetuada pela inoculação de uma alga de 3,0 mm de diâmetro, da suspensão em salina do crescimento de 24 horas, a 37°C, em ágar simples inclinado. Os tubos semeados devem ser arrolhados (rôle-

lhas de horracha ou de cortiça parafinada) e incubados a 37°C durante 18 a 24 horas. Transcorrido este período, acrescentar 3 a 5 gôtas de uma solução a 0,1% de amido, juntando após, com pipeta conta-gôtas, a solução de iôdo N/10.

III — Não havendo redução do tenerationato, verifica-se o desenvolvimento imediato de uma coloração azul, decorrente da reação do amido com uma a duas gôtas do iôdo adicionado. No caso de se efetuar a redução do tenerationato a tiosulfato, não se visualizará a reação de amido com o iôdo, tendendo inclusive o meio a adquirir uma tonalidade amarelada, resultante do excesso deste último. Neste caso, a cultura é qualificada como tenerationato-redutase positiva e o consumo de iôdo é de cerca de 10 a 15 gôtas (aproximadamente 0,25 a 0,3 ml).

## RESULTADOS

O resultado do comportamento das 648 amostras de *Salmonella typhi*, quanto à capacidade de redução do tenerationato, de

TABELA I  
Distribuição regional da tenerationato-redutase em 648 amostras de *S. typhi*

Estados de origem das amostras	Tenerationato-Redutase				Total	
	Positiva		Negativa		Nº	%
	Nº	%	Nº	%		
Bahia	248	95,01	13	4,99	261	40,27
Pernambuco	136	96,45	5	3,54	141	21,73
Guanabara	97	96,03	4	3,96	101	15,53
São Paulo	65	89,04	8	10,95	73	11,26
Estado do Rio	55	94,82	3	5,17	58	8,96
Minas Gerais	8	100,00	—	—	8	1,24
Rio Grande do Sul	6	100,00	—	—	6	0,93
Total	615	94,90	33	5,09	648	99,97

acôrdo com a distribuição numérica e regional, está discriminado na Tabela I.

A análise da Tabela I demonstra a predominância de amostras possuidoras da capacidade de redução do tetrationato, embora tenhamos, em determinadas áreas, um expressivo número de bacilos tíficos não redutores, quando se estabelece uma comparação com a média obtida.

#### DISCUSSÃO

As observações de NICOLLE & LE MINOR<sup>7</sup>, resultantes do estudo de 1978 amostras de *Salmonella typhi*, evidenciaram a existência de uma certa variação de distribuição geográfica das amostras, com reações positivas e negativas. Assim, as culturas provenientes de determinadas áreas do continente europeu e africano, na sua grande maioria, são possuidoras desta enzima. Em contraposição, as do extremo oriente, principalmente do Vietnã e Cambodge, revelaram equivalência nos resultados. Ilustram ainda que, em cerca de 54 amostras isoladas na Argentina, Chile e México, tôdas foram capazes de reduzir o tetrationato e nas 10 amostras isoladas na Guiana Francesa, notaram 40,0% de reações negativas. Contrastando com os resultados obtidos na Europa, PAPAVASSILIOU & col.<sup>8</sup>, em 24 amostras oriundas da Grécia, obtiveram 16 positivas e 8 com reações negativas.

GONZÁLEZ COSTA<sup>1</sup>, examinando 96 culturas de *S. typhi*, isoladas no Equador, teve oportunidade de caracterizá-las como positivas, na sua totalidade.

Em nosso levantamento, analisando os dados encontrados de acôrdo com a Tabela I, verifica-se a predominância de amostras redutoras do tetrationato, totalizando 615 culturas ou 94,90%, embora, na maioria dos estados, observe-se amostras incapazes de agir sobre este substrato, avaliados em 5,09%.

Nestas regiões, pode ser de utilidade o emprêgo desta prova, principalmente se levarmos em conta que os outros meios para a análise epidemiológica não sejam perfeitamente esclarecedores, como ocorreria se houvesse predominância de um número muito restrito de lisotipos Vi, ou se a tipificação bioquímica, segundo Kristensen, indicasse apenas a presença de um tipo fermentativo.

Lógicamente, um inquérito epidemiológico não deverá se restringir aos dados obtidos

de uma única prova, mas nos resultados de uma série de outros testes. Assim sendo, pela facilidade de execução e interpretação, a pesquisa da tetrationato-redutase pode ser considerada como um valioso meio auxiliar, no estudo da incidência ou prevalência do bacilo tífico em uma região e, associado à determinação dos tipos bioquímicos, é plenamente exequível nos exames rotineiros dos laboratórios regionais de Saúde Pública, reservando-se a lisotipia Vi para os chamados Laboratórios de Referência.

#### SUMMARY

#### *Tetrathionate-reductase (TTR) in Salmonella typhi cultures*

The ability to reduce tetrathionate was looked for in 648 strains of *S. typhi*, from different areas in Brazil. It was found present in 94.90% and absent in 5.09% of the strains.

The Authors suggest that the test should be used in epidemiological studies in conjunction with other criteria, as the test of xylose and arabinose fermentation and Vi phage typing.

#### AGRADECIMENTOS

Pela valiosa colaboração no preparo de todo o material, agradecemos ao Sr. José Caetano Alves.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GONZALEZ COSTA, A. — Lisotipia de cepas de *Salmonella typhi* aisladas en El Ecuador. *Rev. ecuat. Hig.*, 29:259-266, 1967.
2. KNOX, R. — The effect of tetrathionate on bacterial growth. *Brit. J. exp. Path.*, 28: 146-150, 1945.
3. KNOX, R.; GELL, P. G. H. & POLLOCK, M. R. — Selective media for organisms of the *Salmonella* group. *J. Path. Bact.*, 54:468-483, 1942.
4. LE MINOR, L. — Distribution de la Tétrathionate-réductase chez divers sérotypes de *Salmonella*. *Ann. Inst. Pasteur*, 113:117-123, 1967.

5. LE MINOR, L. & PICHINOTY, F. — Recherche de la Tétrathionate-Réductase chez les Bactéries Gram négatives anaérobies facultatives (*Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* et *Pasteurella*). *Ann. Inst. Pasteur*, **104**:384-393, 1963.
6. MULLER, L. — Un nouveau milieu d'enrichissement pour la recherche du Bacille typhique et des paratyphiques. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, **89**:434, 1923.
7. NICOLLE, P. & LE MINOR, L. — Sur la présence ou l'absence de la réductase du Tétrathionate dans une collection de bactéries typhiques de provenances variées. *Ann. Inst. Pasteur*, **108**:501-513, 1965.
8. PAPAVASSILIOU, J.; SAMARAKY-LYBEROUPOULOU, V. & PIPERAKIS, G. — Production of Tetraphionate-reductase by *Salmonella*. *Canad. J. Microbiol.*, **15**:238-240, 1969.
9. PICHINOTY, F. & BIGLIARDI-ROUVIER, J. — Etude et Mise au point d'une méthode permettant de mesurer l'activité de Tétrathionate-Réductases d'origine bactérienne. Inhibition par l'oxygène de la biosynthèse et de l'activité de l'enzyme D'Escherichia intermedia. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **28**:134-140, 1962.

Recebido para publicação em 22/3/1971.

## CONTAMINAÇÃO DO SOLO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO PELO *CLOSTRIDIUM TETANI*

### II — Avaliação da ocorrência estacional do bacilo do tétano no solo

Walter TAVARES<sup>(1)</sup>, Roched A. SEBA<sup>(2)</sup> & J. Rodrigues COURA<sup>(3)</sup>

#### RESUMO

Os Autores colheram amostras do solo de diversas regiões do Estado do Rio de Janeiro, em diferentes estações do ano, a fim de verificar se ocorre variação estacional na presença do *C. tetani* no solo. Observaram que em 260 amostras colhidas na primavera a positividade foi de 30,4%; em 96 amostras colhidas no verão a positividade foi de 26,0%; em 130 amostras, durante o outono, a positividade foi de 23,0% e nas 55 amostras colhidas no inverno a positividade foi de 30,9%. A análise estatística dos resultados revelou que a presença do bacilo tetânico, nas amostras colhidas no solo do Estado do Rio de Janeiro, não sofreu variação significativa com as estações do ano, havendo portanto, condições para a população se infectar qualquer que seja a estação.

#### INTRODUÇÃO

Tem sido verificado por diversos Autores que o *C. tetani* pode ser isolado do solo de diferentes regiões da Terra<sup>3-5, 7, 10</sup>, havendo relação entre o grau de contaminação do solo pelo bacilo e o índice de morbidade da doença. Assim, DAMON & PAYABAL<sup>4</sup>, nos Estados Unidos, encontraram o *C. tetani* em 10,5% das amostras de terra estudadas no Estado de Maryland; LAVERGNE & col.<sup>7</sup>, na França, referem a positividade de 50,0% na região de Meurthe-et-Moselle, local de alta incidência do tétano; SERGEEVA & MATVEEV<sup>10</sup> encontraram diferentes percentuais de positividade em amostras colhidas em diversas regiões da URSS e estabeleceram a correlação entre a positividade e a morbidade da doença.

Em trabalho realizado anteriormente<sup>12</sup>, verificamos que o bacilo tetânico é encontrado em alta freqüência no solo do Estado do Rio de Janeiro, tendo sido isolado

em 27,4% de 608 amostras de terra, colhidas durante a primavera, em diferentes regiões do Estado. Pudemos estabelecer a correlação entre o índice de morbidade da doença e a presença do bacilo nos municípios em que é dividido o Estado, sendo maior a incidência do tétano em regiões onde o bacilo foi isolado com maior freqüência.

Em continuidade ao estudo da contaminação do solo pelo *C. tetani* procuramos verificar se existe alguma influência estacional sobre a presença do bacilo tetânico no solo.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Foram colhidas 541 amostras de solo de diferentes municípios do Estado do Rio de Janeiro, durante a primavera, verão, outono e inverno. As amostras foram colhidas em frascos esterilizados, desde a superfície

Trabalho do Serviço de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Antonio Pedro (Fac. Medicina, Universidade Federal Fluminense) e do Instituto Vital Brazil, Niterói, Est. do Rio de Janeiro, Brasil

(1) Assistente da Disciplina de Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Fac. Medicina da Univ. Fed. Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil

(2) Diretor Científico do Instituto Vital Brazil

(3) Professor Titular da Disciplina de Clínica de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Fac. Medicina da Univ. Fed. Fluminense, Rio de Janeiro, Brasil

do solo até uma profundidade de 3,0 a 5,0 cm. A presença do *C. tetani* nas amostras foi averiguada por cultura em anaerobiose e testes biológicos em camundongos. Para realização da cultura, pesou-se 5,0 g de terra e dissolveu-se em 10,0 ml de solução fisiológica de cloreto de sódio, deixando em repouso por 2 horas. Do sobrenadante, aspirou-se 0,5 ml que foi semeado em meio de Tarozzi. A cultura não foi submetida ao calor, pois é referida uma menor produção de toxina em meio tratado pelo calor<sup>10</sup>. Após 4 dias de cultura em anaerobiose, foi inoculado 0,1 ml do sobrenadante da cultura em camundongos pesando 18,0 a 20,0 g, por via intramuscular. Os camundongos foram mantidos em observação por 4 dias, sendo registradas as manifestações de tétano nos animais. Nas amostras que revelaram positividade para o bacilo do tétano, procedeu-se à prova de neutralização, inoculando o material da cultura em camundongos protegidos com 500 unidades de sôro antitetânico.

#### RESULTADOS

Os resultados das culturas das amostras de solo estão relacionados na Tabela I.

Pode-se observar que a positividade do *Clostridium tetani*, nas amostras de solo de cada município estudado, sofreu variações não sendo possível, entretanto, estabelecer a influência estacional dentro de cada região. O número de amostras colhidas em cada município foi muito pequeno em relação à área total, havendo assim, grande influência do acaso. No total de amostras colhidas em cada estação, porém, verifica-se que não houve variação significativa no percentual de positividade para o bacilo tefânico.

A análise estatística dos resultados, apresentada na Tabela II, demonstrou que a positividade nas amostras colhidas não sofreu variação estacional, sendo aceita a hipótese de igualdade nos resultados obtidos.

#### DISCUSSÃO

Tem sido relatada por diversos Autores<sup>2, 6, 8</sup> uma incidência estacional do tétano, sendo referido maior número de casos durante o verão e primavera. Outros Autores, contudo, não encontram incidência estacional marcada, ocorrendo a doença durante todos os meses<sup>1, 9</sup>. Em nosso país, R. VERONESI (Tese, São Paulo, 1960) refere maior incidência durante a primavera; G. Z. LOUZADA (Tese, Pôrto Alegre (RS),

TABELA I

Cultura de solo para demonstração do *C. tetani* em diferentes estações do ano

Município	Prima- vera	Verão	Outo- no	In- verno
	N/P *	N/P *	N/P *	N/P *
Araruama	12/2	—	8/0	3/0
Bom Jardim	10/3	8/2	7/4	2/2
Cach. Macacu	11/4	7/0	8/2	2/0
Campos	20/7	—	9/5	5/2
Cantagalo	14/3	8/2	7/3	2/0
Cas. de Abreu	11/1	—	6/1	4/3
Cordeiro	13/5	10/1	7/2	8/0
Duas Barras	9/2	7/0	4/2	—
Duque de Caxias	20/6	—	7/3	—
Itaboraí	10/3	9/1	7/0	1/1
Macaé	15/4	—	8/0	7/0
Magé	12/6	—	8/2	—
Niterói	20/14	9/8	7/2	14/7
Nova Friburgo	12/2	8/1	8/2	2/0
Rio Bonito	10/2	—	7/0	—
São Fidelis	11/5	—	10/1	—
São Gonçalo	15/5	7/3	—	3/2
São Pedro d'Ald.	16/5	—	6/0	2/0
São Sebastião Alto	10/0	10/2	6/1	—
Terezópolis	3/0	5/4	—	—
Trajano Moraes	6/0	8/1	—	—
Total das amostras	260/79	96/25	130/30	55/17
Positividade	30,4%	26,0%	23,0%	30,9%

\* N = número de amostras colhidas

P = número de amostras positivas

TABELA II

Análise estatística pelo Teste de Igualdade de Proporções

$p^1 = p^2$	t
Inverno × Verão	0,65
Inverno × Outono	1,1
Inverno × Primavera	0,075
Primavera × Verão	0,44
Primavera × Outono	1,3
Verão × Outono	0,5

1965) encontra alta incidência, tanto durante o mês de março (verão) como em agosto (inverno). Em nossa casuística<sup>11</sup>, verificamos que no Estado do Rio de Janeiro o tétano ocorre durante todos os meses, não havendo predomínio estacional.

A maior incidência do tétano nas estações quentes de determinadas regiões tem sido explicada em função de uma maior atividade da população junto à terra. Nos meses quentes as crianças brincam descalças, usa-se menos roupa, os adultos exercem maiores atividades em contacto com o solo em passeios e divertimentos e a atividade agrícola é maior<sup>13</sup> (R. VERONESI, Tese, São Paulo, 1960). Entretanto, nas regiões cujas características climáticas de cada estação não são tão bem definidas, a população pode exercer atividades em contacto com o solo tanto no inverno e outono, como no verão e primavera. Tal fato é o que ocorre no Estado do Rio de Janeiro onde observamos, ainda, que crianças e adultos da classe social mais pobre andam descalças com frequência, independentemente da estação do ano, estando assim sujeitas aos riscos de ferimentos.

Verificamos com este trabalho, que o *C. tetani* é encontrado em alto percentual em todo o Estado e que sua presença nas amostras de solo, estudadas em diferentes estações, não sofre variação significativa havendo, portanto, condições para a população se infectar, qualquer que seja a estação do ano.

#### S U M M A R Y

#### *Soil contamination by Clostridium tetani in Rio de Janeiro State*

The Authors collected soil samples from several districts of Rio de Janeiro State, Brazil, throughout the 4 seasons of the year, in order to investigate the seasonal variation of *Clostridium tetani* in the ground. Out of the 260 samples collected in the spring they observed that 30.4% were positive; 26.0% out of 96 collected in the summer; 23.0% out of the 130 collected in the autumn and 30.9% out of 55 in the winter. A statistical analysis shows that the presence of tetanus bacillus in the soil of Rio de Janeiro State does not suffer significant variations with the seasons and the population may become infected at any time of the year.

#### A G R A D E C I M E N T O S

Os Autores manifestam sua gratidão ao Sr. Jayme Antonio Amaral, técnico do Ins-

tituto Vital Brazil, pela contribuição na realização das culturas e testes biológicos e ao Dr. Maurício de Pinho Gama pela orientação na análise estatística deste trabalho.

#### R E F E R E N C I A S B I B L I O G R Á F I C A S

- AMEZQUITA-URIAS, G. — El tetanos en Mexico. *Higiene (Mex.)*, 16:123-170, 1964.
- AXNICK, N. W. & ALEXANDER, E. R. — Tetanus in the United States. *Amer. J. publ. Hlth*, 47:1493, 1957.
- BESSEMANS, A. & MONTEY, V. — Sur la flore bactérienne anaérobe du sol en Belgique. *C. R. Soc. Biol. (Paris)*, 127:361-363, 1938.
- DAMON, S. R. & PAYABAL, L. B. — Distribution of the spores of bacillus botulinus and bacillus tetani in soil. *J. infect. Dis.*, 39:491-501, 1926.
- DUBOVSKY, B. J. & MEYER, K. F. — The occurrence of *B. tetani* in soil and vegetables. *J. infect. Dis.*, 31:614-616, 1922.
- LAFORCE, F. M.; YOUNG, L. S. & BENNET, J. V. — Tetanus in the United States epidemiologic and clinical features. *New Engl. J. Med.*, 28:569, 1969.
- LAVERGNE, V.; HELLUY, J. R. & FAIVRE, G. — Contribution à l'étude morphologique et biologique du *C. tetani*. *Rev. Immunol. (Paris)*, 13:315-324, 1949.
- MASAR, I. — Epidemiological problems of tetanus in Slovakia. Inter. Conf. Tetanus, 2d, Bern, 1966. Bern, Huber — [c 1967] p. 57-60.
- REY, M.; DIOP MAR, I.; LAFAIX, C.; GUERIN, M. & SCHAAF, B. — Le tetanos à Dakar, problème de Santé Publique. *Bull. Fac. Méd. Pharm. Dakar*, 1968.
- SERGEVA, T. I. & MATVEEV, K. I. — Geographical distribution of *C. tetani* in the soil of URSS. Inter. Conf. Tetanus, 2d, Bern, 1966. Bern, Huber — [c 1967] p. 77-89.
- TAVARES, W. — Estudo epidemiológico do tétano no Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 1970 — 50 p.
- TAVARES, W. & SEBA, R. A. — Contaminação do solo do Estado do Rio de Janeiro pelo *C. tetani*. I. Relação com a distribuição geográfica do tétano. *R. Soc. bras. Med. trop.*, 4:331-343, 1970.
- VITAL STATISTICS — Death from tetanus. *Brit. med. J.*, 1:535, 1951.

Recebido para publicação em 4/12/1970.



## FREQÜÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DO *HAEMOPHILUS VAGINALIS* ISOLADO DE VAGINITIS

Marcelo MAGALHÃES<sup>(1)</sup> & Adelma VÉRAS<sup>(1)</sup>

### RESUMO

Realizou-se um estudo sobre a bacteriologia das vaginites, tendo merecido especial atenção a freqüência e identificação do *Haemophilus vaginalis*.

De 448 culturas examinadas, o *H. vaginalis* foi isolado em 60 ocasiões (13,4%). Em 42 casos, ele foi encontrado em cultura pura ou associado a microrganismos de flora normal ou de potencialidades patogênicas improváveis. Nas 18 culturas restantes, o *H. vaginalis* apresentou-se em associação com a *Trichomonas* sp. ou *Candida albicans*.

Resultados satisfatórios foram obtidos na diferenciação do microrganismo, de outras espécies de *Haemophilus* e de certas corinebactérias encontradas na vagina, em se fundamentando na capacidade e aspecto do crescimento das culturas em caldo tioglicolato adicionado de soro de coelho, fatores V e X, ou sem qualquer suplementação. Por outro lado, quando a imunofluorescência foi empregada com esse mesmo objetivo não houve sucesso, talvez devido à ocorrência de diversos sorotipos de *H. vaginalis*, na região.

### INTRODUÇÃO

Desde o trabalho pioneiro de LEOPOLD<sup>18</sup>, sobre o isolamento de um pequeno bacilo Gram negativo de casos de vaginites inespecíficas, numerosas publicações surgiram relacionadas com esse importante problema ginecológico. Entretanto, existem ainda discordâncias, na literatura, a respeito de aspectos fundamentais da questão. Entre essas, a freqüência e significação clínica dos isolamentos e a posição taxonômica do microrganismo são as mais evidentes.

Devido à Gram negatividade e à necessidade de sangue nos meios de cultivo, o organismo foi incluído no gênero *Haemophilus* e chamado de *H. vaginalis*<sup>15</sup>, embora persistam dúvidas sobre aquela característica citológica e a exigência para os fatores V e X não tenha sido demonstrada<sup>10, 14</sup>. Estes fatos proporcionaram a reclassificação do microrganismo, com o nome de *Corynebacterium vaginalis*<sup>11, 22</sup>.

Os índices de isolamento do *H. vaginalis* variam em ampla faixa, de acordo com os vários Autores. DOLL<sup>6</sup> não conseguiu isolar

nenhuma amostra entre 300 pacientes examinados, enquanto GARDNER & DUKES<sup>15</sup> obtiveram 48,5% de culturas positivas entre os 291 casos estudados. Além disso, estes investigadores isolaram também, o microrganismo, da secreção uretral de maridos de pacientes portadoras de infecções recurrentes e conseguiram infectar mulheres sadias com o *H. vaginalis*, em cultura pura<sup>3</sup>.

No presente trabalho, estuda-se a freqüência de *H. vaginalis* em nosso meio e suas relações de isolamento com outros microrganismos encontrados na vagina. Além disso, procura-se desenvolver um método simples de diferenciá-lo de outras bactérias hemofílicas e de certas corinebactérias vaginais inclassificadas, em se aproveitando variações em exigências nutritivas e de estrutura anti-gênica.

### MATERIAL E MÉTODOS

O material compreendeu 560 corrimentos vaginais obtidos de suspeitos de vaginites, em sua maioria pacientes adultos. Os casos

(1) Departamento de Microbiologia, Faculdade de Medicina, Cidade Universitária, Recife, Brasil

provieram de diversos serviços particulares de ginecologia, existentes no Recife. O material foi colhido no próprio laboratório ou nos consultórios especializados e conservado em salina fisiológica. Apenas uma amostra de cada paciente foi examinada.

#### *Exame Microscópico*

O exame direto foi realizado em preparações úmidas para a detecção de *Trichomonas* sp. e em preparações coradas pelo Gram para controle dos métodos culturais.

#### *Isolamento das Culturas*

O material patológico permaneceu em salina durante 1 a 4 horas, dependendo esse tempo do local da colheita, antes de ser inoculado nos seguintes meios de cultivo:

- a) Meio de Casman<sup>2</sup>, modificado<sup>15</sup>, especialmente dirigido para o isolamento do *H. vaginalis*, embora permita o crescimento de qualquer membro da flora vaginal.
- b) Meio de ágar-sangue de carneiro, para a detecção de *Streptococcus* e de *Staphylococcus*.
- c) Meio de ágar-chocolate, para o isolamento de *Neisseria* e de *Haemophilus*.
- d) Meio GC (Difco), enriquecido com Hemoglobina e Suplemento C (Difco) e contendo vancomicina e colistin, seletivo para *N. gonorrhoeae*.
- e) Meio de Levine, para o isolamento de *Enterobacteriaceae*.
- f) Meio de Sabouraud, adicionado de cloranfenicol, seletivo para *Candida*.

Os meios de Casman, ágar-chocolate e GC foram incubados em atmosfera úmida e rica em CO<sub>2</sub> (candle jar). Não houve qualquer tentativa para o isolamento de bactérias do grupo *Mycoplasma*.

#### *Identificação das Culturas*

Na caracterização bacteriológica do *H. vaginalis* considerou-se as descrições de DUKES & GARDNER<sup>7</sup> e as de LAPAGE<sup>17</sup>. Desenvolveu-se ainda, um método simples para distinguir o *H. vaginalis* das verdadeiras bactérias hemofílicas e de certas corinebactérias vaginais. O método consistiu em inocular a cultura teste em caldo tioglicolato simples (Fluid Thioglycollate, Difco), caldo tioglicolato contendo soro de coelho a 1,0% e caldo tioglicolato suplementado com os fatores V e X. Com o mesmo objetivo, empregou-se também a imunofluorescência di-

reta, tentando-se corar as culturas com um conjugado anti-*H. vaginalis*.

As colônias de *N. gonorrhoeae* foram rapidamente identificadas pela coloração fluorescente<sup>4</sup>.

As amostras de *C. albicans* foram diferenciadas de outras leveduras pela produção de clamidósporos.

Os demais microrganismos foram identificados seguindo-se as instruções gerais contidas nos livros de microbiologia aplicada<sup>5, 19</sup>.

As placas contendo meio de isolamento, que apresentaram crescimento confluinte de *Proteus* foram prejudicadas e não consideradas na avaliação dos resultados. Igual conceito aplicou-se às culturas negativas, em Casman, sob a suposição do uso prévio de antibacterianos tópicos ou colheita inadequada do material.

#### RESULTADOS

Dos 504 espécimes examinados, 196 apresentaram culturas de microrganismos potencialmente patógenos: *C. albicans* 81 (44,3%); *H. vaginalis* 60 (30,6%); *Trichomonas* sp. 51 (26,0%); *N. gonorrhoeae* 4 (2,0%). Estes microrganismos, eventualmente isolados em cultura pura, geralmente apresentaram-se associados entre si e a outras bactérias ubiquitárias na vagina normal ou patológica (Tabelas I e II).

Em 252 casos não foi possível a evidenciação de patógenos vaginais e os microrganismos mais encontrados foram, em ordem decrescente: *S. epidermidis*, *Corynebacterium* sp., *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus*, *S. aureus*, *Str. haemolyticus*, *Str. faecalis*, *Candida* sp., *Neisseria* sp., *H. influenzae*, *Pseudomonas* sp. e *Acinetobacter anitratum*.

Nas últimas 56 culturas a avaliação não foi possível. Em 49 ocasiões, isso foi devido a crescimento de *Proteus* e em 7 casos, a cultura apresentou-se negativa. A Tabela III evidencia uma diferença significativa, quanto a esses aspectos, na dependência da origem de colheita do material.

A maioria de nossas amostras de *H. vaginalis* cresceu pobemente, ou não cresceu de todo no ágar-chocolate ou ágar-sangue de carneiro. Por outro lado, em meio de Casman, a vegetação foi luxuriante e após 48 h. as colônias se tornaram nitidamente distintas, com uma tonalidade branca-acinzentada. A produção de hemólise foi variável, parecendo depender mais de variações nas partidas do meio de cultivo, que de diferenças

TABELA I

Relações de isolamento entre agentes específicos de vaginites e organismos de patogenicidade duvidosa

Agentes específicos	Total de casos	<i>H. vaginalis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Str. haemolyticus</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>H. vaginalis</i>	60	—	5	2	9	1
<i>Trichomonas sp.</i>	51	12	5	7	15	1
<i>C. albicans</i>	81	6	12	6	24	0
<i>N. gonorrhoeae</i>	4	0	1	0	1	0

TABELA II

Relações de isolamento entre agentes específicos de vaginites e organismos de flora normal

Agentes específicos	Total de casos	<i>Lactobacillus</i>	<i>Corynebacterium sp.</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Str. faecalis</i>	<i>Candida sp.</i>
<i>H. vaginalis</i>	60	11	23	43	3	4
<i>Trichomonas sp.</i>	51	4	28	26	7	3
<i>C. albicans</i>	81	29	26	47	4	0
<i>N. gonorrhoeae</i>	4	0	2	2	0	0

TABELA III

Dados sobre o isolamento do *H. vaginalis* e culturas prejudicadas de acordo com a proveniência dos espécimes

Proveniência	Total de culturas		Culturas de <i>H. vaginalis</i>	Culturas não avaliadas				
	N.º	%		N.º	%	N.º	%	
Laboratório de Bacteriologia	375	74,4	44	11,7	44	11,7	2	0,5
Serviço de Ginecologia	129	25,6	16	12,4	5	3,8	5	3,8

entre as amostras. Algumas culturas produziram hemólise do tipo alfa, enquanto outras tornaram o meio castanho, sem qualquer indício de atividade hemolítica. Em caldo tio-glicolato, o *H. vaginalis* cresceu exclusivamente no meio contendo sôro. O crescimento, inicialmente micro-aerófilo, rápidamente

estendeu-se à profundidade do meio e apresentou-se caracteristicamente granulado (puff ball)<sup>7</sup>. As culturas dos verdadeiros *Haemophilus* desenvolveram-se, sómente, na presença dos fatores V e X, enquanto as culturas de *Corynebacterium*, menos exigentes, cresceram em todos os três tipos de

meio, embora mais exuberantemente nos meios suplementados.

Não houve êxito na tentativa da rápida identificação do *H. vaginalis* pela imunofluorescência. Apesar de nosso conjugado, em elevada diluição, haver corado intensamente as amostras de *H. vaginalis*, usadas na imunização dos animais, foi incapaz de reagir com 55,0% das culturas estudadas.

#### DISCUSSÃO

Os índices de infecção vaginal pelo *H. vaginalis*, presentemente encontrados, mostram que o microrganismo é relativamente comum em nosso meio, quando comparado a outros agentes considerados como responsáveis por vaginites. Todavia, em outras partes do mundo, os índices de freqüência são mais elevados<sup>8, 12, 13, 16</sup> e o microrganismo é habitual, mesmo entre pessoas assintomáticas<sup>9</sup>. Variáveis condições de higiene e de hábitos sexuais, entre os grupos investigados, provavelmente contribuem para a obtenção de resultados diferentes. A maioria dos indivíduos da presente série é de clínica privada; de hábitos sexuais não promíscuos, haja visto o pequeno número de *N. gonorrhoeae* isolado; muitos deles, podem haver apresentado corrimento vaginal devido a problemas não infecciosos.

De modo geral, é muito difícil estabelecer a significação etiopatogênica de um microrganismo, isolado de locais onde normalmente existe rica flora microbiana. Entretanto, existem alguns fatos sugestivos da patogenicidade vaginal do *H. vaginalis*. Entre elas, a reprodução da vaginite em se empregando cultivos<sup>3</sup> e o isolamento da bactéria em cultura pura e abundante, de numerosos casos de infecção vaginal, são os mais convincentes. Na presente série, em 42 casos, pelo menos, o *H. vaginalis* poderá ter sido o microrganismo responsável pela vaginite.

Do ponto de vista do diagnóstico microbiológico, a principal dificuldade existente na caracterização bacteriológica do *H. vaginalis* é diferenciá-lo dos verdadeiros *Haemophilus* e, principalmente, de certas corinebactérias inclassificadas da vagina. As culturas originais de AMIES & JOHNS<sup>1</sup> eram, na realidade, *H. influenzae*<sup>17</sup> ou *H. aegyptius*<sup>20</sup> e a freqüência de bacilos difteroides, em corrimentos vaginais e uretrais, é muito elevada. Essas dificuldades de identificação podem, eventualmente, levar a excessivos erros nos índices de freqüência.

Durante o exame de nossas culturas, distinguiu-se dois tipos de corinebactérias. Um deles produziu colônias grandes, rugosas, cresceu bem nos meios de isolamento e suas células apresentaram-se fortemente Gram positivas e tipicamente corineiformes, não proporcionando qualquer problema diagnóstico. O outro tipo, entretanto, cresceu preferentemente em Casman, suas colônias foram muito semelhantes às do *H. vaginalis* e as células bacterianas, embora Gram positivas, não exibiram clavas. Por outro lado, diferentemente de certas amostras de *H. vaginalis* que se apresentam Gram variáveis nos primo-cultivos, logo se tornando francamente Gram negativas, aquelas corinebactérias permanecem Gram positivas, ou mostram grânulos Gram positivos, no decorrer dos subcultivos. A distinção entre o *H. vaginalis* e essas corinebactérias é facilmente conseguida pela observação do crescimento em caldo tioglicolato simples e caldo tioglicolato adicionado de sôro. Em muitos casos, essa diferenciação foi substanciada pelo emprêgo da imunofluorescência direta. Infelizmente, esse rápido método de identificação microbiológica não pôde ser largamente utilizado, porque uma fração ponderável das culturas de *H. vaginalis* deixou de reagir com a globulina fluorescente. Isso, provavelmente, deveu-se à ocorrência, no Recife, de vários sorotipos de *H. vaginalis*. Em outras regiões, essa diversidade antígênica não parece existir, desde que a imunofluorescência foi comparável à cultura, no diagnóstico das infecções vaginais a *H. vaginalis*<sup>21</sup>.

A notável semelhança entre o *H. vaginalis* e determinadas corinebactérias inclassificadas, ao lado da não exigência para os fatores V e X, reforçam as opiniões<sup>11, 12</sup> tendentes a incluí-lo no gênero *Corynebacterium*. Na verdade, ele não pode permanecer por mais tempo entre as bactérias hemofílicas, contudo é mister novos estudos e o desenvolvimento de novos métodos antes de decidir-se em que grupo taxonômico o *H. vaginalis* deve ser colocado.

#### SUMMARY

*Frequence and identification of Haemophilus vaginalis isolated from vaginitis*

A bacteriological study on aetiology of vaginitis was carried out and special importance was given to frequence and identification of *Haemophilus vaginalis*.

The *H. vaginalis* was isolated 60 times (13.4%) from 448 cultures of vaginal discharges. It was found in pure cultures or in association to microorganisms of the normal flora or bacterias of dubious pathogenicity in 42 cases. In the left 18 specimens it was associated to the *Trichomonas* sp. or *Candida albicans*.

Satisfactory results were obtained in the differentiation of the microorganism from other species of *Haemophilus* and some unclassified corynebacteria ubiquitous of vagina, based on growth aspect and their ability to propagate in fluid thioglycollate media with rabbit serum, V and X factors, or without any supplementation. On the other hand, unsuccessful results were observed when immunofluorescence was used to that purpose, presumably because many serotypes of *H. vaginalis* must exist in our region.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMIES, C. R. & JOHNES, S. A. — A description of *Haemophilus vaginalis* and its L forms. *Canad. J. Microbiol.*, **3**:579-590, 1957.
2. CASMAN, E. P. — Noninfusion blood agar base for neisseria, pneumococci and streptococci. *Amer. J. clin. Path.*, **17**:281-289, 1947.
3. CRISWELL, B. S.; LADWIG, C. L.; GARDNER, H. L. & DUKES, C. D. — *Haemophilus vaginalis*: vaginitis by inoculation from cultures. *Obstet. and Gynec.*, **33**:195-199, 1969.
4. DANIELSSON, D. — The demonstration of *N. gonorrhoeae* with the aid of fluorescent antibodies. 6: A comparison of conventional methods and fluorescent antibody (FA) techniques with counterstaining for the demonstration of *N. gonorrhoeae*. *Acta derm.-venereol. (Stockh.)*, **45**:74-80, 1965.
5. DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY — 2<sup>nd</sup> ed. Saint Louis, The C. V. Mosby Co., 1966.
6. DOLL, W. — Vorkommen von "Haemophilus vaginalis" bei "unspezifischer vaginitis". *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.*, **171**:372-379, 1958.
7. DUKES, C. D. & GARDNER, H. L. — Identification of *Haemophilus vaginalis*. *J. Bact.*, **81**:277-283, 1961.
8. DUNKELBERG Jr., W. E. & BOSMAN, R. I. — *Haemophilus vaginalis*: Incidence among 431 specimens examined. *Milit. Med.*, **126**:920-922, 1961.
9. DUNKELBERG Jr., W. E.; HEFNER, J. D.; WYMAN Jr., F. J. & ORUP, H. I. — *Haemophilus vaginalis* among asymptomatic women. *Obstet. and Gynec.*, **20**:629-632, 1962.
10. DUNKELBERG Jr., W. E. & McVEIGH, I. — Growth requirements of *Haemophilus vaginalis*. *Antonie v. Leeuwenhoek*, **35**:129-145, 1969.
11. DUNKELBERG Jr., W. E.; SKAGGS, R. & KELLOGG Jr., D. S. — A study and new description of *Corynebacterium vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*). *Amer. J. clin. Path.*, **53**:370-377, 1970.
12. DUNKELBERG Jr., W. E.; SKAGGS, R.; KELLOGG Jr., D. S. & DOMESCIK, G. K. — Relative incidence of *Corynebacterium vaginalis* (*Haemophilus vaginalis*), *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas* sp. among women attending a venereal disease clinic. *Brit. J. vener. Dis.*, **46**:187-190, 1970.
13. EDMUNDS, P. N. — *Haemophilus vaginalis*: its association with puerperal pyrexia and leucorrhoea. *J. Obstet. Gynaec. Brit. Emp.*, **66**:917-926, 1959.
14. EDMUNDS, P. N. — The growth requirements of *Haemophilus vaginalis*. *J. Path. Bact.*, **80**:325-335, 1960.
15. GARDNER, H. L. & DUKES, C. D. — *Haemophilus vaginalis*: newly defined specific infection previously classified "nonspecific" vaginitis. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, **69**:962-976, 1955.
16. KUMMEL, F. J. — Klinische und bakteriologische untersuchungen über die unspezifischer scheidenentzündung. *Arch. Gynäk.*, **199**:5-42, 1963.
17. LAPAGE, S. P. — *Haemophilus vaginalis* and its role in vaginitis. *Acta path. microbiol. scand.*, **52**:34-54, 1961.
18. LEOPOLD, S. — Heterofore undescribed organism isolated from genito-urinary system. *U. S. armed Forces med. J.*, **4**:263-266, 1953.
19. MANUAL FOR THE IDENTIFICATION OF MEDICAL BACTERIA — London, Adlard & Son Ltd., 1965.
20. REDMOND, D. L. & KOTCHER, E. — Cultural and serological studies on *Haemophilus vaginalis*. *J. gen. Microbiol.*, **33**:77-87, 1963.
21. REDMOND, D. L. & KOTCHER, E. — Comparison of cultural and immunofluorescent procedures in the identification of *Haemophilus vaginalis*. *J. gen. Microbiol.*, **33**:89-94, 1963.
22. ZINNEMANN, K. & TURNER, G. C. — The taxonomic position of *Haemophilus vaginalis* (*Corynebacterium vaginalis*). *J. Path. Bact.*, **85**:213-219, 1963.

Recebido para publicação em 7/4/1971.



## THE INFLUENCE OF OXYGEN ON THE RESISTANCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* TO STREPTOMYCIN

Silvio Armando Corrêa CAMBA<sup>(1)</sup>, Flávio ALTERTHUM<sup>(2)</sup>  
& Lucio Penna de Carvalho LIMA<sup>(3)</sup>

### SUMMARY

The action of streptomycin on resting cell suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* was studied in order to test the hypothesis that the drug enters the cell by an active transport mechanism. This hypothesis was put forth to explain the increased resistance of facultative organisms growing in anaerobic conditions. The results show that prolonged aeration of the suspensions, prior to the addition of streptomycin increase the resistance to the drug. These results may be explained by assuming that aeration, by reducing the endogenous metabolism and therefore the amount of available energy, also reduces significantly the amount of streptomycin entering the cell.

### INTRODUCTION

BONDI et al.<sup>2</sup>, in 1946, observed that the antibacterial activity of streptomycin against several microorganisms, whose growth was favored by oxygen, was significantly reduced upon incubation in anaerobiosis. They also noted that the same result could be obtained by the addition of reducing agents to the test medium. To explain these results they presented the hypothesis that streptomycin blocked some oxidative enzymatic system indispensable for organisms growing in aerobiosis.

We have observed the same phenomenon with *Pseudomonas aeruginosa*, with one important difference: the interference of oxygen is quite apparent with a strain with a low level of resistance, whereas with highly resistant strains no difference is observed whether incubation is aerobic or anaerobic. This fact is rather curious. If one of the causes of death due to streptomycin is the interference with respiration processes, there should be a difference regardless of the resistance level. Tentatively we put forth the hypothesis that the increased activity of

streptomycin, in aerobic conditions, is due to an increase in the transport of the drug across the membrane. This would be quite significant in microorganisms with a low grade of resistance but might be completely masked in resistant strains where the increase in the amount of the drug transported would have to be quite large to have any effect.

To test this hypothesis, therefore, we studied the activity of streptomycin upon a resting cell suspension whose endogenous respiration was progressively exhausted; in other words we worked with different suspensions having progressively smaller amounts of available energy. If our hypothesis is valid, the reduction of the endogenous activity should lead to an increased resistance to streptomycin.

### MATERIALS AND METHODS

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 7.700 was used throughout. The culture medium was

This investigation was supported by grant, from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(1) Fellow of the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

(2) Assistant Professor of the Department of Biochemistry.

(3) Full Professor of the Department of Biochemistry

Present address of the Authors: Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade de São Paulo, Caixa Postal 20.780, São Paulo, Brasil

Oxoid's Antibiotic Medium no. 3. Streptomycin sulphate was employed in a buffered solution (Sorensen's phosphate buffer, pH 7.0) containing 780.0 mg/g.

The bacterial suspension was prepared in the following way: a 24 hour culture was centrifuged at 4,500 rpm for 10 minutes. The supernatant was discarded and the cells washed and resuspended in the buffer solution. The turbidity was adjusted to 6.0 N.U. in a Coleman Nephelometer, which corresponded to approximately  $10^8$  cells/ml.

From this suspension 0.1 ml were removed and mixed with 9.9 ml of a buffered solution containing 100.0 mg/ml of streptomycin sulphate. From time to time samples were removed for viable counts.

This experiment was repeated after the suspension was aerated during 24, 48 and 168 hours to reduce endogenous metabolism. Aeration was accomplished by shaking in a New Brunswick rotatory shaker (240 rpm). All counts were made in duplicate and control experiments without the antibiotic were performed at the same time.

#### RESULTS

The results are presented in Fig. 1.

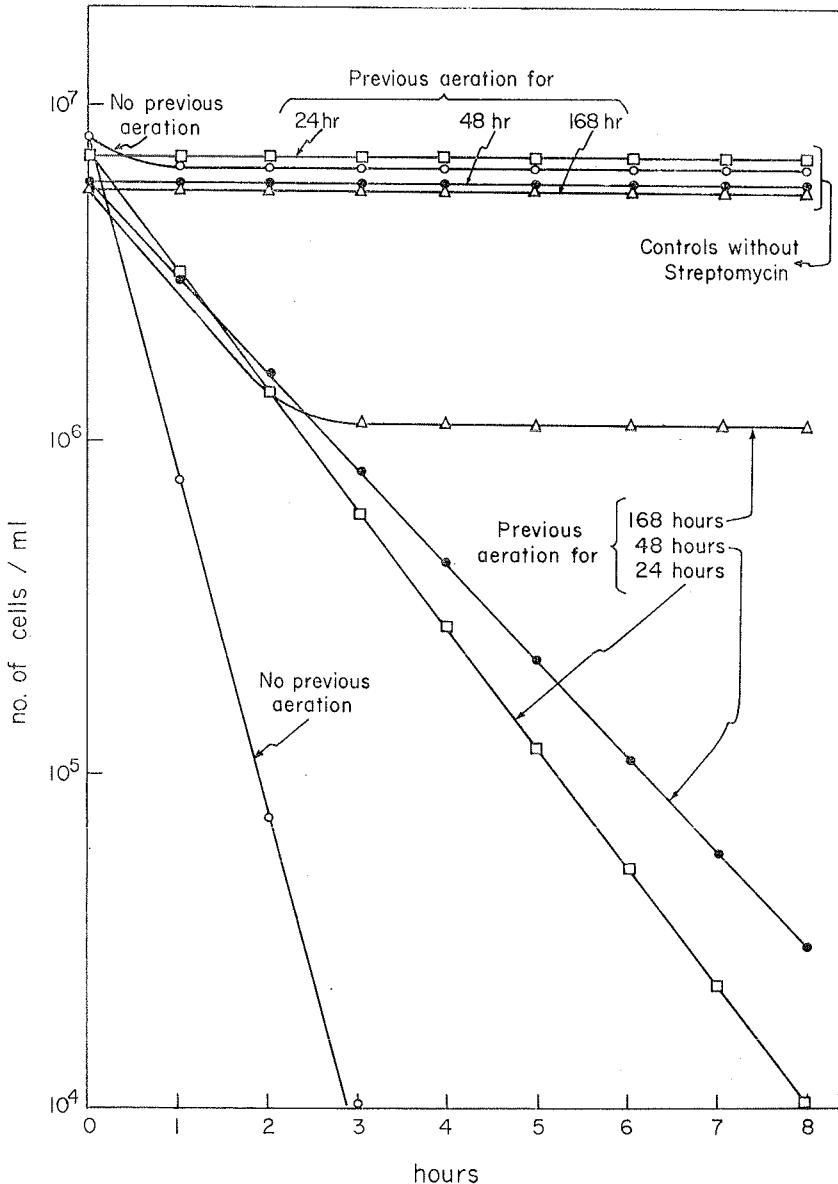


Fig. 1 — Time survival curves for resting cell suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* to which 100.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of streptomycin were added and subjected to varying degrees of preliminary aeration.

## DISCUSSION

The results presented furnish a few facts which merit discussion. In the first place it is quite obvious that streptomycin is effective in a resting cell suspension, the number of viable cells being significantly reduced after exposure to the drug. A small reduction is apparent even in the absence of the drug. This should be expected since a few cells should die from starvation, although the high level of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* keeps this reduction at a minimum.

After exposure to streptomycin, however, the reduction in the viable number is quite large but one notices a progressive decrease in the efficiency of the drug when the resting cell suspension is aerated before the addition of the antibiotic. This should also be expected for, as a rule, antibiotics are active only when cells are metabolising. In a recently prepared suspension there is a sufficient amount of endogenous metabolism to ensure this result. The reduction of endogenous metabolism by prolonged aeration would inhibit the action of the drug.

At this point however, a further consideration must be made. If the drug enters the cell by a passive mechanism, and attaches itself to the ribosomes, as postulated by several Authors<sup>3-7, 9, 10</sup> protein synthesis is inhibited and the cells eventually die. This being the case there should be no difference between cells with large endogenous metabolism and cells with low levels of endogenous metabolism, since on further cultivation the ribosomes coupled to the streptomycin would remain inactive. In order to explain our results, therefore, another mechanism must be involved. In our opinion it is necessary to assume that streptomycin enters the cell through an active transport mechanism involving the expenditure of energy. This being the case, the existence of a reasonable amount of endogenous metabolism furnishes the necessary energy for this penetration. Prolonged aeration reduces this energy production to very low levels and the amount of streptomycin entering the cells is insufficient to attach itself to all of the ribosomes; aeration of the resting cell suspensions, therefore, would lead to an increased resistance to the drug.

Another aspect might be considered. WHITE & WHITE<sup>11</sup> studying the synergism between streptomycin and puromycin suggest that to be sensitive to the former, ribosomes

must be in a special sensitive state. They suggest that the sensitive site is concealed during protein synthesis, probably by messenger RNA. If streptomycin enters the cell passively, prolonged aeration, by reducing protein synthesis, should render the cells more sensitive to the antibiotic. Our results show the opposite. There is no contradiction, however, if one assumes that a smaller amount of streptomycin enters the cell, in this condition, for lack of energy. Although more ribosomes are sensitive, there is not enough streptomycin to become attached to all of them; therefore the cell survives.

This is also in good agreement with the work of PAINE & CLARK<sup>8</sup>, who showed that killing of cells by streptomycin is most rapid in the presence of glucose as substrate, less rapid in the presence of glutamate and fumarate and least rapid in the absence of added substrate, and that killed cells could not be revived by repeated washings in an attempt to remove the streptomycin. Glucose is a good source of energy thus favouring the entrance of the drug and if the streptomycin is attached to the ribosomes and not merely adsorbed to the surface, as suggested by BERKMAN et al.<sup>1</sup>, it cannot be removed by washing.

## RESUMO

*A influência do oxigênio na resistência de Pseudomonas aeruginosa à estreptomicina*

Os Autores estudaram os efeitos de estreptomicina em suspensão não proliferante, de *Pseudomonas aeruginosa*. Verificaram que há um aumento da resistência à estreptomicina, à medida que as células vão tendo seu endógeno progressivamente consumido.

Para explicar este fato, os Autores propõem um mecanismo de transporte ativo, intimamente relacionado com as disponibilidades energéticas da célula.

## REFERENCES

- BERKMAN, S.; HENRY, R. J.; HOUSWRIGHT, R. D. & HENRY, J. — Streptomycin. IV. Adsorption of streptomycin by susceptible and resistant bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.)*, 68:65-70, 1948.
- BONDI Jr., A.; DIETZ, C. C. & SPAULING, E. H. — Interference with the antibacterial action of streptomycin by reducing agents. *Science*, 103:399-401, 1946.

3. COX, E. C.; WHITE, J. R. & FLANKS, J. G. — Streptomycin action and the ribosome. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **51**: 703-709, 1964.
4. DAVIES, J. — Studies on the ribosomes of streptomycin-sensitive and resistant strains of *E. coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **51**:659-664, 1964.
5. DAVIES, J.; JONES, D. S. & KHORONA, H. G. — A further study of misreading of Codons induced by streptomycin and neomycin using Ribopolynucleotides containing two nucleotides in alternating sequence as Templates. *J. molec. Biol.*, **18**:48, 1966.
6. KAJI, H. & KAJI, A. — Specific binding of r-RNA to ribosomes: effects of streptomycin. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **54**: 213, 1965.
7. OLD, D. & GORINI, L. — Aminoacid changes provoked by streptomycin in a polypeptide synthetized "in vitro". *Science*, **150**:1290, 1965.
8. PAIN JR., T. F. & CLARK, L. S. — The effect of streptomycin on oxygen uptake and viability of resting suspension of *E. coli*. *Science*, **118**:73-74, 1953.
9. PESTKA, S.; MARSHALL, R. & NIREM BERG, M. — RNA codeworks and protein synthesis. V. Effects of streptomycin on the formation of ribosomes s-RNA complexes. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **53**:639, 1965.
10. SPOTTS, C. R. & STANIER, R. Y. — Mechanism of streptomycin action on bacteria: a unitary hypothesis. *Nature (Lond.)*, **192**:633-637, 1961.
11. WHITE, J. R. & WHITE, H. L. — Streptomycin antibiotics synergism by puromycin. *Science*, **146**:772-773, 1964.

Recebido para publicação em 20/3/1971.

## ANTI-RABIES REVACCINATION IN HUMANS

### I — Effect of different schedules on individuals previously vaccinated with 14 or more doses

Octavio Augusto Carvalho PEREIRA<sup>(1)</sup>, Ney COUTINHO<sup>(2)</sup>,  
Terezinha RAPHAELIAN<sup>(3)</sup> & Antonella GODANO<sup>(4)</sup>

#### SUMMARY

The Authors have studied the immune response in 87 cases of anti-rabies revaccination. The patients had been vaccinated before, within varying periods of time and were submitted to different revaccination schedules.

The evaluation of results was done through the Complement Fixation Test (CF) and, in some instances, also by Serum Neutralization Test (SN).

The time elapsed since the last vaccination does not have any influence on the results, but the number of doses does. A small percentage of the patients revaccinated with a single dose did not respond, while the group having received 4 or 5 doses attained the maximal response.

#### INTRODUCTION

The proceeding to be followed for prophylaxis of rabies in patients not previously vaccinated is well standardized and established. But, when a patient previously vaccinated is exposed to new contagion, there frequently arise doubts as to the measures to be taken.

Based on what is known on immune response, in general, the experts of the WHO<sup>6</sup> recommend to give just one booster dose in cases of injuries considered as of slight severity and 5 doses in more serious accidents. They do recognize, however, that there are no sufficient experimental data for a definite establishment of such proceeding.

COHEN et al.<sup>3</sup> have noticed rapid and intense elevation of the antibody titers with the employment of one single booster dose in individuals vaccinated 1 year before, some of which still showed appreciable levels at the time of revaccination.

LE BELL et al.<sup>4</sup> and PEREIRA et al.<sup>5</sup> observed more intense, precocious and lasting responses in cases of revaccination than in primarily vaccinated individuals.

The object of the present paper is to present the results obtained with revaccination of a number of cases, all having been vaccinated before with series of 14 or more doses.

We have attempted to study the effect of different schedules and the influence which the time elapsed since the last contact with the antigen, might have on the immunologic response.

The evaluation of this response was made through the CF test, the correlation of which with the classical SN has been demonstrated in a previous paper<sup>5</sup>. Whenever possible and according to availability of mice, we have done the SN in order to test such correlation.

- (1) Departament of Microbiology and Parasitology of the Escola Paulista de Medicina. Rua Botucatú 862, São Paulo, Brasil  
(2) Pronto-Socorro Contra Raiva, São Paulo, Brasil  
(3) Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa, São Paulo, Brasil  
(4) Instituto Pasteur, São Paulo, Brasil

## MATERIALS AND METHODS

## 1) Patients

Eighty-seven patients were selected, all with a past history of anti-rabies vaccination but without antibodies detectable through CF. Of this group, 11 had been vaccinated from 6 to 12 months before; 32 between 1 and 3 years; 14 vaccinated 3-5 years before; 15, 5-10 years before and 15, over 10 years before.

of revaccination, and the second 20-25 days afterwards. Only patients which were negative by CF, before revaccination, were included in the experiment.

The sera were separated in sterile conditions and kept at -25°C until used.

## 3) Complement Fixation Test (CF)

The technique employed was that described by PEREIRA et al.<sup>5</sup>.

TABLE I

Complement fixing antibodies in human sera collected after anti-rabies revaccination

Last Vaccination	No. of Doses	Titer by CF				Total
		—	2	4	> 4	
6-12 months	1				8	8
	2-3				1	1
	4-5				2	2
1-3 years	1	3	3	2	11	19
	2-3		1		3	4
	4-5				9	9
3-5 years	1			1	6	7
	2-3				4	4
	4-5				3	3
5-10 years	1				3	3
	2-3				4	4
	4-5				8	8
over 10 years	1		1		1	2
	2-3		1	1	1	3
	4-5			2	8	10
Total		3	6	6	72	87

Vaccines of the FERMI, SEMPLE, and FUENZALIDA & PALACIOS types had been employed at the primary vaccination, and in some instances this information could not be obtained.

Revaccination was always done with the FUENZALIDA & PALACIOS type vaccine. The number of doses varied and their distribution can be seen on Tables I and II.

## 2) Sera

Two blood samples were taken from each patient: the first on the day of the beginning

TABLE II

Medium titer of complement fixing antibodies according to the number of doses after anti-rabies revaccination

Number of Doses	Patients	Medium Titer by CF
1	39	28.8
2-3	16	66.7
4-5	32	84.3

#### 4) Serum Neutralization Test (SN)

This was done according to ATANASIU<sup>2</sup> using the CVS strain.

#### RESULTS

Of the 87 cases, an immune response, detectable through CF, was obtained in 84 (96.8%). The other 3 patients (3.5%) belong to the group having received a single booster dose, all of them vaccinated for the first time between 1 and 3 years before.

In 72 cases (82.7%) we found antibody titers above 4, while 12 (13.7%) showed 2 or 4. These results are summarized on Table I.

The SN test was done with 39 sera, all of them corresponding to the 2nd collection (20-25 days after revaccination). These were divided into 2 groups according to the availability of animals, 60 and 38 LD<sub>50</sub> having been obtained in the virus titrations.

Of the 3 sera which were negative by CF, 2 were submitted to SN, showing titers of 17 and 33. All others (positive by CF) showed neutralizing titers above 48. The general distribution of the results appears on Table III.

terature<sup>3, 4, 5</sup> and with what is generally known about antigenic stimulation. However, we found some patients whose response could not be considered satisfactory. The incidence was small (3 in 87) and all belonged to the group which had been revaccinated with a single dose. It is to be remarked, however, that the other 36 patients submitted to the same schedule showed an effective response.

As can be observed on Table II, there occurred a heightening of the medium titer of complement fixing antibodies when a larger number of doses was given. But even the titer 28.8 obtained with a single dose is about 3 times higher than the medium titer obtained in the primary vaccination by PEREIRA et al.<sup>5</sup>.

With 2-3 doses we have always found detectable antibodies, and with 4-5 they consistently presented a titer equal to (2 cases) or above 4 (30 cases), as can be seen on Table I. The medium titer of this latter group (84.3) is practically the same as obtained by PEREIRA et al.<sup>5</sup> for individuals revaccinated with 10-14 doses, i.e., 89.8. Thus, it does not seem necessary to employ series of more than 5 doses, which would only increase the risk of a neuroparalytic accident, the incidence of which is strongly

TABLE III

Relationship between titer of complement fixing and neutralizing antibodies after anti-rabies revaccination

CF SN	—	2	4	> 4	Total
< 25	1				1
25 to 125	1	4	1		6
> 125		2	5	25	32
Total	2	6	6	25	39

#### DISCUSSION

The results obtained show that the response to a second stimulation through anti-rabies vaccine on the whole is very efficient, in consistence with the specialized li-

influenced by the number of doses employed, according to APPELBAUM et al.<sup>1</sup>.

The time elapsed since the last vaccination does not seem to have any influence, and even patients vaccinated over 10 years before showed effective response. In this

group there was one patient who had been vaccinated 40 years earlier and who attained the titer 32 by CF, after revaccination with 4 doses.

The results of the 39 sera in which SN was performed agree with the correlation established between this reaction and the CF<sup>5</sup>.

In short, it seems to us quite clear that anti-rabies revaccination can be carried out with a small number of doses, but that a single dose may produce faulty results. Of course we have no proof that the primary vaccination in these cases has stimulated an immune response, but in the routine of anti-rabies services this verification is not done.

The checking of results of revaccination with few doses should therefore be done systematically, specially when a single booster dose is used and it seems to us that the CF test, for its quickness and good correlation with the SN, is apt to offer the security desired.

#### RESUMO

*Revacinação anti-rábica humana. I. O Efeito de diferentes protocolos em indivíduos vacinados anteriormente com 14 ou mais doses*

Os Autores estudaram a resposta imune em 87 casos de revacinação anti-rábica. Os pacientes haviam sido vacinados há diferentes períodos de tempo e foram submetidos a diferentes protocolos na revacinação.

A avaliação dos resultados foi feita por Fixação de Complemento (FC) e, em algumas ocasiões, também por Sôro-Neutralização (SN).

Concluem que o tempo decorrido desde a última vacinação não influiu nos resultados, mas que o número de doses sim. Numa pequena porcentagem dos pacientes revacinados com dose única não houve resposta, enquanto o grupo que recebeu 4 ou 5 doses atingiu a resposta máxima.

#### REFERENCES

- APPELBAUM, E.; GREENBERG, M. & NELSON, J. — Neurological complications following anti-rabies vaccination. *J. A. M. A.*, 151:188-191, 1953.
- ATANASIU, P. — Titrage des anticorps rabiques pratiqué sur les serums humains. *Bull. Off. Int. Epiz.*, 67:383-387, 1967.
- COHEN, D.; TIERKEL, E. S.; SIKES, R. K. & COHEN, S. M. — Antibody response to rabies booster inoculation in prophylactically immunized human volunteers. *Bull. Org. mond. Santé*, 31:426-429, 1964.
- LE BELL, I.; DEBOER, C.; HAZZ, E. L. & COX, H. R. — Complement fixing and neutralizing antibodies on human vaccinated against rabies. *Proc. Soc. exp. Biol.*, 73:225-228, 1950.
- PEREIRA, O. A. C.; RAPHAELIAN, T. & COUTINHO, N. — Complement fixation test in evaluation of immunity against rabies. *Rev. Microbiol.*, 1:85-91, 1970.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Expert Committee on Rabies. Fifth Report. Techn. Rep. Ser. No. 321, 1966.

---

Recebido para publicação em 16/4/1971.

## A COMPARISON BETWEEN THE LÖWENSTEIN-JENSEN AND AND AMERICAN TRUDEAU SOCIETY CULTURE MEDIA FOR ISOLATION OF TUBERCLE BACILLI IN PATHOLOGICAL SPECIMENS NEGATIVE TO MICROSCOPIC EXAMINATION

Ezequiel WAISBICH<sup>(1)</sup>, Luiz Roberto Viana FERNANDES<sup>(2)</sup>  
& Alexandre La Rocca ROSSI<sup>(3)</sup>

### S U M M A R Y

In comparative studies of culture media for the primary isolation of tubercle bacilli from pathological material, it is of fundamental importance to work with paucibacillary specimens. In this experiment, we compared results obtained in 1432 positive cultures of some pathological samples which had been negative to microscopical examination. The Löwenstein-Jensen culture medium was shown to be statistically superior to the American Trudeau Society medium in every way, but for the contamination aspect. However, our results show the convenience of utilizing more than a single culture medium for the isolation of tubercle bacilli.

### I N T R O D U C T I O N

A number of culture media devised mainly for the primary isolation of tubercle bacilli<sup>1-20</sup>, among other uses, are described in the current literature. Several of these more recent culture media seem to be promising in promoting a quicker growth of Koch's bacillus. However, since the methods and media used depend on the facilities available, they have not been extensively studied in laboratories. In such conditions, egg media of various compositions seem to be the most utilized ones, for reasons pointed out by CUMMINGS<sup>6</sup>. According to this Author, the ideal media should have the following characteristics:

- 1) Support the rapid growth of a small number of tubercle bacilli.
- 2) Permit the easy differentiation between pathogenic and nonpathogenic acid-fast

bacilli, through the morphology of the colonies.

- 3) Inhibit the growth of contaminating microorganisms.
- 4) Be simple in preparation, utilizing readily available ingredients.

Among these egg media the most widely used are the Löwenstein-Jensen (L-J) and the American Trudeau Society (ATS).

In our laboratory we have used during a long time exactly these particular two culture media, based on the fact that more than one single type medium should be used simultaneously for routine diagnosis of tubercle bacilli. However, in view of the promising reports about modern types of media, we have outlined a research project on the simultaneous testing of some of them.

Publication of the "Divisão de Tisiologia e Pneumologia Sanitária do Instituto de Saúde"; Rua da Consolação 717, São Paulo, Brasil  
(1) Assistant Professor of the "Departamento de Bioquímica da Universidade de São Paulo"; Bacteriologist of the "Associação dos Sanatórios Populares de Campos do Jordão", São Paulo, Brasil  
(2) Assistant Professor of the "Faculdade de Medicina de Mogi das Cruzes", São Paulo, Brasil  
(3) Assistant Professor of "Departamento de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da U.S.P.", São Paulo, Brasil

Since, in the pertinent publications, many of comparisons between two media have employed laboratory strains or only a small number of specimens and as we have considered only pathological specimens which had been negative to microscopic examination, we believe that our results represent a good contribution to the problem.

#### MATERIALS AND METHODS

The specimens tested were sputum, gastric and tracheo-bronchial washings, from out-patients that were sent to us for diagnosis, treatment control and post-cure control. It is important to stress that only samples, negative to microscopic examination by the Ziehl-Neelsen method, were used in the present study. To prepare the concentrates, 4.0% NaOH containing 0.004% phenol red as an indicator was added to each sputa in equivalent volumes, and to the other specimens, in the proportion of 1:10. The samples were then shaken at room temperature during 20 to 30 minutes depending upon the solubility of the material. Centrifuging was at 2000 r.p.m., during 15 minutes. The supernatant fluid of each specimen was then poured off and the sediment neutralized with 4.0% HCl. A fresh sterile cotton swab was used to streak each tube of medium with the concentrate. The swab containing the inoculum was rotated as it was streaked up and down the medium slant. The same method was employed using 2 tubes of Löwenstein-Jensen medium and 2 tubes of the American Trudeau Society medium. The seeding order of the different media varied. Cultures were incubated at 37°C and were considered negative when colonies were not visible after 60 days of observation through a magnifying glass. They were considered positive when the colonies were morphologically typical for *M. tuberculosis* and showed characteristic acid-fast bacilli in stained smears. In doubtful cases, microscopic examination and biochemical studies were carried out. The positivity of the cultures was recorded as follows:

- a) (+) — 1 to 10 colonies
- b) (++) — 11 to 50 colonies
- c) (+++) — 51 to 100 colonies
- d) (++++) — more than 100 colonies

The statistical method we utilized was that of the comparison between two proportions.

$$\text{We used the "csi" value } \xi = \frac{\text{dif}}{\sigma(\text{dif})}$$

We adopted the following statistical convention:

- a) (?) — possibly significant
- b) (\*) — significant
- c) (\*\*) — highly significant
- d) (\*\*\*) — high statistical certainty

#### RESULTS

To detect tubercle bacilli in some pathological specimens 13361 cultures were made. We employed 9008 sputa, 3536 tracheobronchial washings and 817 gastric washings on Löwenstein-Jensen and American Trudeau Society media. On Table I we present the general analysis of our results.

1432 cultures were positive, i.e., 10.7%. The comparison of the positivity observed in each medium, with reference to the 1432 positive specimens, showed that 986 out of them, i.e., 68.9%, were positive in both media. 264 (18.4%) were positive only in the L-J medium and 182 (12.7%) showed positivity in the ATS and were negative in the L-J. Therefore, while 1250 (87.3%) specimens were positive in the L-J, in the ATS medium the number of positive specimens was 1168 (81.6%). Such information represent high statistical certainty ( $\xi = 4.51 ***$ ),  $p << 0.1\%$ . Nevertheless, such results still point to the convenience of utilizing more than one culture medium for the isolation of tubercle bacilli.

The number of positive culture tubes was as follows: 2186 (51.9%) in the L-J medium and 2023 (48.1%) in the ATS medium, which also represents high statistical certainty ( $\xi = 3.6 ***$ ),  $p << 0.1\%$ . As Table I shows, there was an apparent tendency of better growth in the L-J medium, as compared with ATS. The contamination was relatively low in both media, no statistical differences being noted.

#### DISCUSSION

When we try to compare the efficacy of culture media for the primary isolation of tubercle bacilli from pathologic materials,

TABLE I

Comparison between the Löwenstein-Jensen and American Trudeau Society Culture media for the primary isolation of *Mycobacterium tuberculosis*

			Number	Per Cent	
<b>A — General Analysis of Specimens</b>					
Total of specimens			13331	100.0	
Total of positive specimens			1432	10.7	
Total of contaminated specimens			107	0.8	
<b>B — Comparison of Positivity</b>					
Total of positive specimens			1432	100.0	
Positive L-J, positive ATS			986	68.9	
Positive L-J, negative ATS			264	18.4	
Negative L-J, positive ATS			182	12.7	
Total of positive specimens L-J			1250	87.3	
Total of positive specimens ATS			1168	81.6	
Total of positive culture media tubes			4200	100.0	
Total of positive tubes L-J			2186	51.9	
Total of positive tubes ATS			2023	48.1	
<b>C — Comparison of Amount of Growth</b>					
L-J	No.	%	ATS	No.	%
+	1004	45.9	+	1005	49.7
++	370	16.9	++	339	16.7
+++	373	17.1	+++	325	16.1
++++	430	20.1	++++	354	17.5
Total	2186	100.0	Total	2023	100.0
<b>D — Comparison of Contamination</b>					
Total of tubes each medium			23722	100.0	
Total of tubes contaminated L-J			253	1.3	
Total of tubes contaminated ATS			333	1.3	

especially for diagnostic purposes, a very important fact has to be considered, i.e., to test paucibacillary materials. Reviewing the literature, we did not find comparative studies on the Löwenstein-Jensen and the American Trudeau Society media, involving any large numbers of samples. We have also verified that in a number of these investigations, laboratory strains or only a small number of specimens were employed. Since there are some conflicting reports about the evaluation of the various culture media described, and since it is fundamental that in mycobacteriology laboratories each worker shares his personal experience, we decided to publish our results. Furthermore, we have tested only those pathological specimens which were negative to Ziehl-

Neelsen examination, a condition we consider of fundamental importance when the efficacy of culture media for primary isolation of tubercle bacilli, is aimed. However, it is necessary to recall that the present study was performed under routine laboratory conditions and that the results presented must be interpreted from this point of view. Moreover, an important information supplied to the clinicians, namely, the developing time of the colonies, was not always recorded by us. This is a most regrettable fact. It should be pointed out that no statistical differences were observed between the various types of specimens, that being the reason for our summarizing in a single Table, the whole of our results.

In our experience, the Löwenstein-Jensen has proved to be better than the American Trudeau Society culture medium in the yield of positive results, but its contamination rate was slightly higher. The low percentage of culture positivity was perhaps related to the selection of the patients. On the other hand, relatively low percentage of contaminated cultures probably shows that we employed drastic methods of decontamination. Procedures that are less toxic to mycobacteria are now under study in our laboratory. In such conditions we hope to obtain better results very soon. Just like other investigators, we observed with more frequency a large number of atypical colonies on the tubes with the American Trudeau Society medium, which tended to be moist and creamy and often required microscopical examination, virulence tests, and biochemical proofs to determine whether or not they were tubercle bacilli, acid fast saprophytes or only contamination. On Löwenstein-Jensen medium the colonies were more frequently dry, rough, and friable, and were easier to differentiate from acid-fast saprophytes. Nowadays, however, with the progress of chemotherapy, we have more difficulties concerning to typical colonial morphology.

#### RESUMO

*Comparação entre os meios de cultura de Löwenstein-Jensen e American Trudeau Society, no isolamento do bacilo da tuberculose de materiais patológicos negativos ao exame microscópico.*

Quando se trata da comparação de meios de cultura para o isolamento do bacilo da tuberculose de materiais patológicos, consideramos de fundamental importância trabalhar com amostras paucibacilares. Nesta experiência nós comparamos os resultados obtidos em 1432 culturas positivas, de alguns materiais patológicos que se revelaram negativos ao exame microscópico. O meio de cultura de Löwenstein-Jensen, em relação ao meio de cultura da American Trudeau Society, mostrou-se estatisticamente superior em todos os aspectos, com exceção da contaminação. Entretanto, os nossos resultados mostram a conveniência da utilização de mais de um meio de cultura para o isolamento do bacilo da tuberculose.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr. Boris Schneidermann for his assistance in the statistical analysis of the data.

#### REFERENCES

- American Trudeau Society: Report of the Committee on Evaluation of Laboratory Procedures of American Trudeau Society. *Amer. Rev. Tuberc.*, 54:428-432, 1946.
- CERRUTI, C. F. — The culture of *B. tuberculosis* on Petagnani's medium. *J. trop. Med. Hyg.*, 35:157-158, 1932.
- CORPER, H. J. & COHN, M. L. — The nutrient quality of eggs for growing tubercle bacilli. *Amer. J. Hyg.*, 18:1-25, 1933.
- CORPER, H. J. & COHN, M. L. — Media for tubercle bacilli: An evaluation of different media for diagnostic cultures of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 46:560-567, 1942.
- CORPER, H. J. & UYEI, N. — The isolation of tubercle bacilli from contaminated tuberculous materials. *Amer. Rev. Tuberc.*, 16:299-322, 1927.
- CUMMINGS, M. M. — Diagnostic methods in tuberculosis: II. Demonstration of *M. tuberculosis* by culture. *Amer. J. clin. Path.*, 21:684-690, 1951.
- DAVIS, B. D. & DUBOS, R. J. — The binding of fatty acids by serum albumin, a protective growth factor in bacteriological media. *J. exp. Med.*, 86:215-228, 1947.
- DUBOS, R. J. & MIDDLEBROOK, G. — Media for tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 56:334-345, 1947.
- HIRSCH, J. G. — Charcoal media for the cultivation of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 70:955-976, 1954.
- HOLM, J. & LESTER, V. — Diagnostic demonstration of tubercle bacilli. *Acta tuberc. Scand.*, 16:310-329, 1941.
- MCNABB, A. L. — Cultural methods of isolation of tubercle bacilli. *Amer. J. publ. Hlth.*, 26:619-624, 1936.
- MELVIN, I.; KLEIN, G. C.; JONES, W. & CUMMINGS, M. M. — An evaluation of media for diagnostic cultures of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 63:459-469, 1951.
- MIDDLEBROOK, G. & COHN, M. L. — Bacteriology of tuberculosis: Laboratory methods. *Amer. J. publ. Hlth.*, 48:844-853, 1958.
- PEIZER, L. R. & SCHECTER, C. — A new medium for bacteriologic diagnosis of tuberculosis. *Amer. J. clin. Path.*, 20:682-685, 1950.

15. SASANO, K. T. & MEDLAR, E. M. — Egg-yolk-potato medium: Its efficiency for demonstrating small numbers of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, **48**:297-303, 1943.
16. SCHWABACHER, H. — A comparison of different media for the growth of tubercle bacillus. *Tubercle (Edim.)*, **18**:199-205, 1937.
17. SHAFFER, M. F. — A comparison of certain media for the cultivation of tubercle bacilli from sputum. *Amer. Rev. Tuberc.*, **27**:259-269, 1933.
18. SMITH, C. R. — Clinical comparison of several culture media in the diagnostic demonstration of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, **63**:470-475, 1951.
19. SULA, L. — WHO Co-operative studies on a simple culture technique for the isolation of mycobacteria: Preparation, lyophilization and reconstitution of a simple semi-synthetic concentrated liquid medium; culture technique; growth pattern of different mycobacteria. *Bull. Wld Hlth Org.*, **29**:589-606, 1963.
20. TARSHIS, M. S. — Blood mediums for cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*: V. Results with Agar-Agar Basal Medium and Varying Concentrations of Blood, Glycerine and Penicillin. *Amer. J. clin. Path.*, **23**:661-670, 1953.

Received para publicação em 8/1/1971.



## RESISTÊNCIA DO PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS, “IN VITRO”, À ANFOTERICINA B

Aurélia Lopes CASTRILLON<sup>(1)</sup> & Paulo Suyoshi MINAMI<sup>(2)</sup>

### RESUMO

O desenvolvimento de resistência à anfotericina B, por 4 amostras leveduriformes de *Paracoccidioides brasiliensis*, foi estudado pela técnica de gradientes de Szybalski, em placas e tubos de meio contendo concentrações crescentes da droga.

Após sucessivas passagens em concentrações crescentes obteve-se culturas resistentes a 200,0 µg de anfotericina B por ml de meio.

### INTRODUÇÃO

A anfotericina B é um polieno com estrutura semelhante à da nistatina, candidina e pimaricina, com boa atividade contra fungos patogênicos.

A sensibilidade do *Paracoccidioides brasiliensis* aos antibióticos é muito pequena. A anfotericina B é um dos poucos ativos contra este fungo e é utilizada no tratamento da blastomicose sul-americana, moléstia por ele causada<sup>4, 5, 6</sup> (S. A. P. SAMPAIO — Tese, São Paulo, Fac. Med. Univ. de São Paulo, 1960). Segundo LACAZ & col.<sup>7</sup>, essa droga inibe, “in vitro”, o crescimento da fase leveduriforme do *Paracoccidioides brasiliensis*, nas concentrações de 0,1 a 0,6 µg/ml de meio. A anfotericina pode atingir, após injeção endovenosa, concentrações no sôro humano de até 2,01 µg/ml, sendo obtidas concentrações médias de 1,21, 0,62 e 0,32 após 1 h., 18 h. e 42 h., respectivamente.

Estudos sobre a resistência dos fungos patogênicos aos antibióticos vêm sendo feitos por vários Autores.

STOUT & PAGANO<sup>10</sup> demonstraram que uma em 5 amostras de *Candida albicans* era resistente à nistatina e outros polienos. Reciprocamente, amostras resistentes a outros polienos tornaram-se resistentes à nistatina.

LITTMAN & col.<sup>8</sup> estudaram 6 espécies de *Candida* (uma amostra de cada) para obter resistência à nistatina e anfotericina B. A amostra de *Candida albicans* foi sensível. *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* e *Candida stellatoidea* desenvolveram resistência às duas drogas, enquanto a *C. parakrusei* mostrou-se resistente sómente à anfotericina B.

SORENSEN & col.<sup>9</sup>, empregando a anfotericina B, selecionou amostras resistentes de *Candida albicans* e *Coccidioides immitis*. As resistentes à anfotericina B tornaram-se resistentes à nistatina e não à pimaricina.

HEBEKA & SOLOTOROVSKY<sup>3</sup> conseguiram obter amostras de *C. albicans* resistentes à candidina e anfotericina B, havendo resistência cruzada entre estes dois polienos.

Estudando amostras de *Cryptococcus neoformans* BODENHOFF<sup>1</sup> induziu facilmente resistência de 5 delas à nistatina e à anfotericina B, menos facilmente à tricomicina e polimixina B. Duas amostras, em 3 resistentes à nistatina, mostraram-se com resistência cruzada aumentada à anfotericina B, enquanto que resistência cruzada à nistatina foi observada nas 3 amostras resistentes à anfotericina B.

(1) Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas junto ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

(2) Professor Assistente Doutor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Faculdade de Medicina da U.S.P. e do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da U.S.P.

Pela importância que representa a anfotericina B no tratamento da blastomicose sul-americana, torna-se necessário conhecer adequadamente o desenvolvimento da resistência do *Paracoccidioides brasiliensis* à referida droga.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Usamos 4 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* (n.<sup>o</sup>s 8, 13, 175 e SN) da Micoteca do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. As culturas foram transformadas em leveduriformes por passagens sucessivas no meio de Brain Heart Infusion Agar a 37°C e examinadas ao microscópio para comprovar a transformação.

Foi utilizada a anfotericina B, produto comercialmente conhecido como Fungizon (Squibb).

Empregamos o meio de Brain Heart Infusion Agar enriquecido com extrato de levedura, com a seguinte fórmula:

Brain Heart Infusion desidratado (Oxoid) .....	37,0 g
Extrato de levedura .....	1,0 g
Agar (Difco) .....	15,0 g
Água destilada .....	1000,0 ml
Ajustar o pH a 7,4.	
Autoclavar a 120°C durante 20 min.	

A técnica de gradiente de Szybalski<sup>11</sup> foi utilizada nas primeiras passagens usando-se o meio anteriormente referido.

A solução da droga continha 50,0 mg de anfotericina B diluída em 10,0 ml de água destilada estéril, preparada no momento do uso.

As placas continham 15,0 ml de meio sem droga na camada inferior e 15,0 ml de meio com droga na camada superior. Eram conservadas em estufa durante duas horas para eliminar a água de condensação e, imediatamente após, semeadas.

A solução de anfotericina B, nos volumes de 0,05, 0,1, 0,5 e 1,0 ml, foi acrescentada ao meio fundido a mais ou menos 45°C, dando no final 100,0 ml de meio com droga, com as seguintes concentrações finais: 2,5, 5,0, 10,0, 100,0 e 200,0 µg/ml nos tubos. As placas foram semeadas com suspensões salinas leveduriformes de *P. brasiliensis* espalhando-se o inóculo por toda a superfície do meio. Os tubos foram semeados colocando-se o inóculo em 3 ou 4 pontos da super-

fície do meio. Em seguida, as placas e os tubos foram incubados a 37°C.

#### RESULTADOS

Com a técnica de Szybalski foi possível selecionar 3 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* resistentes à anfotericina B.

A amostra 13 cresceu inicialmente nas placas de gradiente com 2,5 e 5,0 µg/ml, após 13 dias. Na segunda, houve crescimento até 10,0 µg/ml aos 15 dias. Na terceira passagem, observou-se bom crescimento até 25,0 µg/ml e menor em 50,0 µg/ml (Tabela I). Colônias desta última concentração foram transferidas sucessivamente em tubos contendo 50,0, 100,0, 150,0 e 200,0 µg/ml, verificando-se crescimento regular. A cultura matriz filamentosa e leveduriforme foi repicada nos tubos com 50,0, 100,0 e 200,0 µg/ml, sem nenhum crescimento. A forma resistente a 200,0 µg/ml não apresentou dependência à droga, crescendo bem no meio sem droga.

A amostra SN cresceu inicialmente em placas contendo 2,5, 5,0 e 10,0 µg/ml, na segunda passagem em 2,5 e 5,0 µg/ml e na terceira até 50,0 µg/ml. A partir desta concentração, as culturas repicadas sucessivamente no stubos contendo 50,0, 100,0 e 200,0 µg/ml apresentaram crescimento. A cultura matriz filamentosa e leveduriforme não desenvolveu quando repicada nas concentrações acima. Não foi observada a dependência à droga.

A amostra 8, após 4 tentativas negativas, cresceu no gradiente de Szybalski contendo 2,5, 10,0 e 50,0 µg/ml, não desenvolvendo em 5,0 e 25,0 µg/ml. Na passagem seguinte, houve crescimento em 2,5, 5,0, 25,0 e 50,0 µg/ml. A partir dessa concentração a amostra foi repicada sucessivamente em 100,0, 150,0 e 200,0 µg/ml, com crescimento. A cultura-mãe não cresceu nos tubos com droga a 100,0, 150,0 e 200,0 µg/ml.

A amostra 175, na primeira passagem, cresceu sólamente na placa de 2,5 µg/ml. Na segunda passagem, houve crescimento nas placas com 2,5, 5,0, 10,0, 25,0 e 50,0 µg/ml. A partir desta última concentração foi repicada sucessivamente em 50,0, 100,0, 150,0 e 200,0 µg/ml, com crescimento. A cultura-mãe não cresceu nos tubos com droga.

#### DISCUSSÃO

As observações feitas por STOUT & PAGAN<sup>10</sup>, SORENSEN & col.<sup>9</sup> e LITTMAN & col.<sup>8</sup>,

T A B E L A I

Crescimento das amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* nas passagens em meios gradientes

Amostras	Concentrações de anfotericina B em placas gradientes de Szybalski ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )					Passagens
	2,5	5,0	10,0	25,0	50,0	
13	+	+	-	-	-	1. <sup>o</sup>
	+	+	+	-	-	2. <sup>o</sup>
						3. <sup>o</sup>
SN	+	+	+	-	-	1. <sup>o</sup>
	+	+	-	-	-	2. <sup>o</sup>
	+	+	+	+	+	3. <sup>o</sup>
8	+	-	+	-	+	1. <sup>o</sup>
	+	+	-	+	+	2. <sup>o</sup>
175	+	-	-	-	-	1. <sup>o</sup>
	+	+	+	+	+	2. <sup>o</sup>

+ Com crescimento.

- Ausência de crescimento.

que estudaram antibióticos como a nistatina, anfotericina B, polimixina, etc., conseguindo desenvolver linhagens de *Candida albicans* e outras *Candidas*, *Cryptococcus neoformans* e *Coccidioides immitis*, o presente trabalho acrescenta estudos demonstrando a existência de formas resistentes de *Paracoccidioides brasiliensis*, à anfotericina B.

Tendo sido utilizadas anteriormente técnicas em meio líquido com diluições graduadas de droga e de Szybalski, demos preferência a esta última, pela facilidade e clareza nos resultados. Tomou-se o cuidado de diluir a droga em temperatura próxima à da solidificação do ágar e também de usar placas, tubos e soluções recentemente preparadas, a fim de evitar possível inativação da droga.

As amostras matriz, tanto a filamentosa como a leveduriforme, por precaução, foram semeadas em meio contendo anfotericina B, nas concentrações de 50,0, 100,0, 150,0 e 200,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Não se observou crescimento, sendo isto esperado, pois a droga age em baixas concentrações, como observaram LA-

CAZ & col.<sup>7</sup>. As amostras cresceram bem em meio isento de droga.

Note-se que na primeira passagem em gradiente, como no caso da amostra 13, o fungo cresceu nas placas contendo baixas concentrações de anfotericina B (2,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) aumentando na segunda e terceira passagens. Na última passagem, observou-se crescimento nos tubos contendo anfotericina B, nas concentrações crescentes de 50,0, 100,0, 150,0 e 200,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , quando repicadas sucessivamente.

Tendo BODENHOFF<sup>1</sup> observado que o *Cryptococcus neoformans* tornou-se dependente da polimixina B, tentamos obter o mesmo resultado com o *Paracoccidioides brasiliensis* em relação à anfotericina B, porém infrutíferamente.

A demonstração de resistência, "in vitro", do *Paracoccidioides brasiliensis* à anfotericina B leva-nos a pensar no possível aparecimento de formas resistentes nos doentes tratados com a droga, pois alguns deles, submetidos a essa terapêutica, não apresentam melhora e outros apresentam recidiva.

## SUMMARY

*The resistance of Paracoccidioides brasiliensis to amphotericin B "in vitro"*

The development of the resistance of 4 *Paracoccidioides brasiliensis* strains to amphotericin B was investigated by the Szybalski gradient technic and in tubes with progressive concentrations of the drug.

After making subcultures in increasing concentrations it was possible to select cultures resistant to amphotericin B, up to 200,0 µg/ml of culture medium.

## REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BODENHOFF, J. — Development of strains of *Cryptococcus neoformans* resistant to nystatin, amphotericin B, trichomycin B. *Acta path. microbiol. scand.*, **73**:572-582, 1968.
2. FIELDS, B. T.; BATES, J. H. & ABERNATHY, R. S. — Amphotericin B serum concentrations during therapy. *Appl. Microbiol.*, **19**:955-959, 1970.
3. HEBEKA, E. K. & SOLOTOROVSKY, M. — Development of resistance to polyene antibiotics in *Candida albicans*. *J. Bact.*, **89**:133-139, 1965.
4. HILDICK-SMITH, G.; BLANK, H. & SAR-KANY, C. — Fungus diseases and their treatment. Boston, Little Brown, 1964.
5. LACAZ, C. S. — Terapêutica das micoses. São Paulo, Fundo Editorial Prociex, 1960.
6. LACAZ, C. S. & SAMPAIO, S. A. P. — Tratamento da blastomicose sul-americana com anfotericina B. Resultados preliminares. *Rev. paul. Med.*, **52**:443-450, 1958.
7. LACAZ, C. S.; ULSON, C. M. & SAMPAIO, S. A. P. — Ação "in vitro" da anfotericina B, sobre o *Paracoccidioides brasiliensis*. *Rev. paul. Med.*, **54**:357, 1959.
8. LITTMAN, M. L.; PISANO, M. A. & LANCASTER, R. M. — Induced resistance of *Candida* species to nystatin and amphotericin B. *Antibiot. Ann.*, p. 981-987, 1957-1958.
9. SORENSEN, L. J.; McNALL, E. G. & STERNBERG, T. H. — The development of strains of *Candida albicans* and *Coccidioides immitis* which are resistant to amphotericin B. *Antibiot. Ann.*, p. 920-923, 1958-1959.
10. STOUT, H. A. & PAGANO, J. F. — Resistance studies with nystatin. *Antibiot. Ann.*, p. 704-710, 1955-1956.
11. SZYBALSKI, W. & BRYSON, B. — Genetics studies on microbial cross resistance to toxic agents. Cross resistance of *Escherichia coli* to five antibiotics. *J. Bact.*, **64**: 489-499, 1952.

Received for publication on 15/2/1971.

## BIOSYNTHESIS OF THE SIDE CHAIN PORTION OF *SALMONELLA TYPHIMURIUM "O" ANTIGEN*

Tomoko HIGUCHI <sup>(1)</sup>

### INTRODUCTION

### CHEMICAL COMPOSITION OF THE LIPOPOLYSACCHARIDE GENETICS

### BIOSYNTHESIS OF THE SIDE CHAIN

1. Formation of the trisaccharide
2. Linkage of the intermediates to lipid
3. Identification of the carrier lipid
4. Formation of the polymer

### METABOLIC CONTROL

### REFERENCES

### SUMMARY

Lipopolysaccharide is the main component of the Gram negative bacterial cell wall. It is of immunological significance in the members of the family *Enterobacteriaceae*. The polysaccharide portion of the macromolecule carries the antigen specificity and it has been extensively studied in *Salmonella typhimurium*. Polysaccharide is composed of backbone core and side chain. The specificity is determined by the sequence and number of the sugars in the side chain. Biosynthesis of the side chain has been extensively investigated. The isolation of mutants of incomplete molecule and the observation that the cell free extracts are able to incorporate sugars from their precursors, have provided evidence for the sequential addition of sugars. So, in the mutants so far studied, the molecule is formed by polymerization of the intermediates linked to a carrier lipid. The linkage of the sugar to a membrane bound lipid could be a way of sugar transport through the membrane. The carrier has been identified as a C<sub>55</sub> polyisoprenoid alcohol. Control mechanisms of side chain biosynthesis remains to be solved.

### INTRODUCTION

The cell wall is the surface structure of bacteria with unique properties. Its essential functions are the maintenance of cell shape, rigidity, and protection against the environment, and other properties of biological significance.

Structurally, the bacterial cell wall is composed of 3 layers; the outermost is lipopro-

tein, the intermediate layer is of a lipopolysaccharide nature and the innermost is glycopeptide. The layered structure was deduced by their selective removal, chemical analysis and electron microscopy<sup>21, 23, 45</sup>. The relative amount of the layers is related to the nature of the Gram reaction of the organism<sup>7, 42</sup>.

(1) Assistant Professor, Departamento de Bioquímica — Instituto de Química, Universidade de São Paulo. C.P. 20.780, São Paulo, Brasil

Lipoprotein is present in a higher amount in Gram negative bacteria and there is some indication of the presence of phage receptor sites in this layer<sup>21</sup>. There cannot be a continuous external lipoprotein surface, since the intact cell reacts with antibodies corresponding to the internal layer antigens.

Mucopeptide or glycopeptide is the major component of Gram positive organism, ranging from 50.0 to 80.0% of the wall. Chemically, it is a polymer composed of chains of N-acetyl glucosamine and N-acetyl muramic acid linked by peptides. It can be removed by lysozyme treatment of the cell suspension, therefore the cell becomes protoplast and lyses. This is one evidence that the rigidity of the bacterial cell is due to the glycopeptide layer.

Lipopolysaccharide (LPS) is the main component of the Gram negative bacterial cell wall. It is of immunological significance in certain organisms, namely, the members of the family *Enterobacteriaceae*<sup>17, 20, 22</sup>. LPS has both, toxic and antigenic properties, and hence it is called either endotoxin or "O" antigen. The toxicity is primarily due

such as: treatment of bacterial cultures with solvents, enzymes, freezing and cooling, grinding with abrasives and sonic vibration<sup>42</sup>.

Sonic vibration treatment of bacterial cell suspensions is the more frequently used method to disrupt Gram negative organisms<sup>33</sup>. Fragments are separated by differential centrifugation of broken cells. Using this technique, the fraction corresponding to the cell envelope comes down at 40000 × g centrifugation. The polysaccharide is extracted from this pellet by treating it with hot phenol as proposed by WESTPHAL & JANN<sup>55</sup>. The fragments are analysed after acid hydrolysis, methylation and periodate oxidation with further characterization.

Several years ago, SALTON<sup>42</sup> determined the individual components of the cell wall, and based on recent biosynthetic results it is possible to establish the sequence of different sugars in the macromolecule.

The *Salmonella typhimurium* polysaccharide structure is considered in 3 parts, as shown in Figure 1:

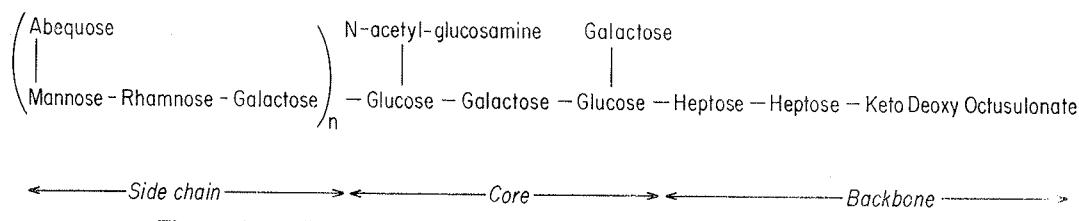


Figure 1 — Polysaccharide structure of *Salmonella typhimurium* G-30.

to the lipid portion while the polysaccharide carries the antigen specificity, although the whole molecule is necessary for immunogenicity<sup>17, 20</sup>. The composition of LPS as well as its biosynthesis is very complex. It has been the subject of continued studies by biochemists, geneticists and chemists, during the past ten years.

In the present review, we have summarized what has been done only on the biosynthesis of the part of the macromolecule responsible for antigen specificity. Reviews covering other aspects, as structure, biosynthesis of the lipopolysaccharide, peptido-glycan and immunology of endotoxin have been published by several investigators<sup>16, 24, 25, 31, 43</sup>.

#### CHEMICAL COMPOSITION OF THE LIPOPOLYSACCHARIDE

Cell wall separation can be accomplished by several physical and chemical methods,

- a) backbone-composed of keto deoxyoctusulonate (KDO), heptose and phosphoethanolamine, linked to the core;
- b) core-composed of glucose, galactose and N-acetyl glucosamine;
- c) side chains-repeating units of galactose, rhamnose and mannose with non-reducing abequose branches.

OSBORN<sup>29, 30</sup> have determined the connection between lipid A and the backbone by keto deoxyoctusulonate. The backbone and the core are quite homogeneous and have almost the same structure in all members of the genus *Salmonella*<sup>32</sup>. The cores differ from one another, either by the 1-4 or 1-6 glucose linkage.

One strain differs from each other in the composition and specially by the sequence of the sugars in the side chains, so it de-

termines the antigen specificity. Novel sugars were found in the side chains as colitose (3,6-dideoxy-L-galactose), paratose (3,6-dideoxy-D-glucose), tyvelose (3,6-dideoxy-D-mannose) and so on<sup>9, 18, 19, 34</sup>.

Recently, NIKAIDO<sup>26</sup> proposed that the side chains are linked to C-4 of the subterminal D-glucose residue of the core.

The antigen specificity can be determined chemically and immunologically by reaction with the corresponding anti-serum. LUDE-RITZ et al.<sup>20</sup> and other investigators<sup>2, 17, 46</sup> classified numerous serologically distinct "O" antigenic groups. The serological scheme is quite complex due to the existence of only small differences in specificity. Today, it is known that variation can be obtained from phage conversion, hence, temperate bacteriophages such as E<sup>15</sup>, E<sup>34</sup>, Ø<sup>27</sup>, P<sup>22</sup>, iota, etc. are able to introduce either O-acetyl groups or glucosyl branches and even changes in the polysaccharide configuration or linkages<sup>2, 39, 51, 52</sup>.

#### GENETICS

Members of the family *Enterobacteriaceae* have two main types of polysaccharides. In the wild type organisms the lipopolysaccharide is complete, due to the fact that it contains backbone, core, and side chains. In *Salmonella typhimurium*, the macromolecule has the structure shown in Figure 1, while in the mutant strains of this species the cell wall polysaccharide is incomplete<sup>34</sup>. The latter group is composed of several organisms with different sizes of the polysaccharide molecule, giving rise to rough colonies on solid media.

*Types of mutants.* Mutants have a different composition of their cell wall depending on the degree of deficiency, precisely, the

more frequent deficiency is in the interconversion enzymes of precursors compounds<sup>25</sup>. Figure 2 shows the pathways of nucleotides sugar synthesis from glucose<sup>13</sup> and the enzymes involved in the conversions.

If the organism, like *Salmonella typhimurium* G-30, lacks the enzyme UDP-galactose-4-epimerase, UDP-galactose is not formed from glucose, and the cell wall polysaccharide from this mutant results incomplete, unless external galactose is provided in the medium<sup>8, 12, 33</sup>. In the same way, the strain M-2 from ZELEZNICK et al.<sup>34</sup> has a phosphomannose epimerase deficiency; thus the conversion of glucose to GDP-mannose is blocked. STOCKER et al.<sup>47, 49</sup> had shown mutants with difference in sensitivity to phages; this fact is a great advantage for precise distinction among mutants.

The degree of sugar deficiency can also be determined by complement fixation tests and inhibition of hemagglutination reactions. The mutants are divided in two main groups, indicated as *rfa* and *rfb*<sup>5, 18</sup>: *rfa* mutants are defective in the biosynthesis of the "R" core and *rfb* organisms synthetized a complete core but are defective in the synthesis of "O" side chains.

The *rfa* mutants may be defective in the synthesis of either the precursor or glycosyl transferases. Five subgroups can be distinguished depending on the composition of their core:

Ra-contains N-acetylglucosamine, galactose, glucose, heptose and KDO; Rb-lacks only N-acetylglucosamine; Rc-contains glucose, heptose and KDO; Rd-heptose and KDO and Re-contains only KDO. It is also possible to consider subdivisions among the subgroups depending on the relative amount of the different sugars in each one, hence Rd<sub>1</sub> would contain twice as much heptose as Rd<sub>2</sub>.

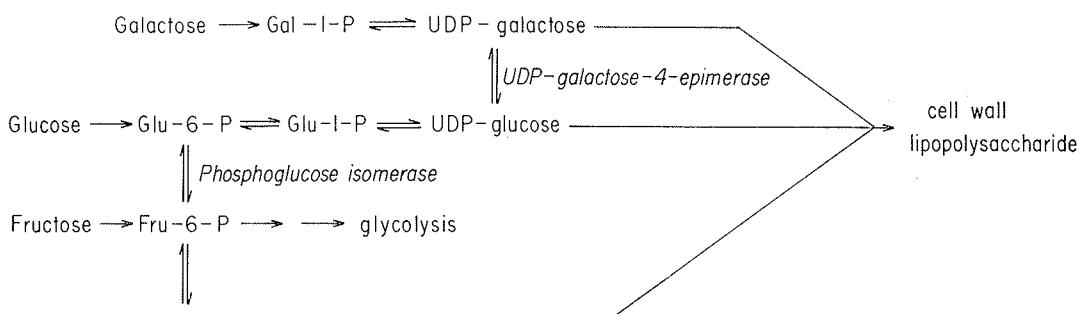
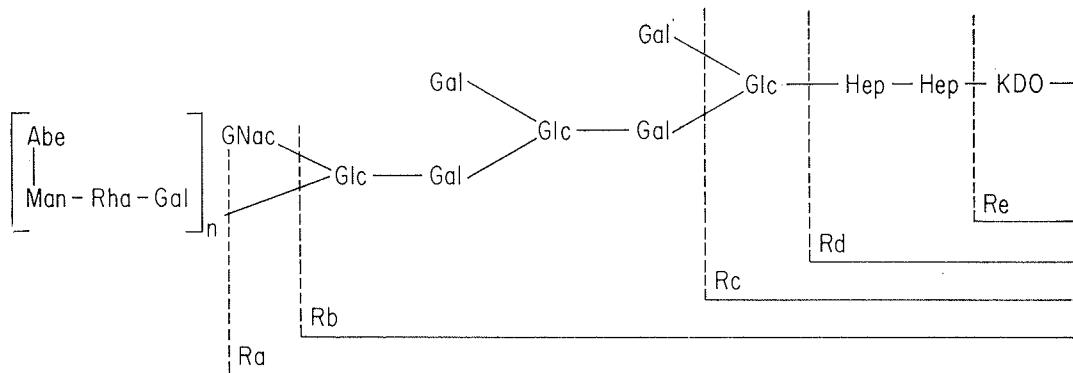


Figure 2 — Pathways of interconversion of sugar nucleotides<sup>34</sup>.

Figure 3 -- Types of mutants of *Salmonella typhimurium*<sup>31</sup>.

In the *r/b* group 3 possibilities have to be considered: deficiencies in the synthesis of the nucleotide sugars precursors, in the synthesis of the polimeric "O" side chains and inability to transfer the synthetized chain to the core.

There is an unusual group of mutants called "semirough", having only one side chain<sup>14</sup>. YUASA et al.<sup>57</sup>, using gas chromatography techniques of acetylated methyl aldits, concluded that semirough strains cannot polymerize the "O" repeat unit, but transfer the unpolymerized repeating unit to the core.

#### BIOSYNTHESIS OF THE SIDE CHAIN

##### 1. Formation of the trisaccharide

In the past 10 years, the biosynthesis of the endotoxin side chain has been studied in several organisms, like *Salmonella typhimurium*, *Salmonella anatum*, *Salmonella newport*, *Escherichia coli* and others<sup>3, 8, 10-12, 15, 28, 33</sup>.

Biosynthetic studies were mainly based on two important observations made by NIKAIKO<sup>25</sup> and his co-workers<sup>27</sup>: 1) mutants with incomplete and different lipopolysaccharides could be isolated; 2) under appropriate conditions, the cell free extracts from these organisms were able to incorporate sugars from their precursors, giving an acid insoluble macromolecular product.

WIENER et al.<sup>53, 54</sup> showed the sequence of monosaccharides in the side chain, by means of incorporation studies in cell free extracts of *Salmonella typhimurium* G-30.

Frozen cells, broken by sonic vibration and extracted with warm phenol, give a fraction, usually called the particular frac-

tion, which contains, besides the incomplete polysaccharide, an acceptor for the biosynthesis of the missing portion of the molecule<sup>34, 40</sup>.

The incubation of the particulate fraction with UDP-galactose-C<sup>14</sup> resulted in the incorporation of the radioisotope into the pellet. Hence, there was a transfer of galactose and rhamnose from their nucleotide, UDP-galactose and TDP-rhamnose. The incorporation of galactose was much greater than that of rhamnose and independent of the presence of other nucleotide sugars. WIENER et al.<sup>54</sup> and NIKAIKO & NIKAIKO<sup>28</sup> reported that this was due to the incorporation of part of the radioactive galactose into the core. On the other hand, mannose transfer depends on the presence of both UDP-galactose and TDP-rhamnose. This sequential addition of sugars is strong evidence for the order of the monosaccharides in the side chain.

From the experimental results shown above, we concluded that the side chain of *Salmonella typhimurium* G-30 is composed of repeating units of galactose, rhamnose and mannose<sup>53</sup>. The radioactive compound can be separated electrophoretically, subjected to hypoidite oxidation, hydrolyzed and then characterized.

##### 2. Linkage of the intermediates to lipid.

The di and trisaccharide intermediate forms are linked to a carrier of lipidic nature and are extractable with organic solvents. Once the molecule is ready for polymerization, the lipid is released in the medium<sup>53, 54, 56</sup>.

The formation of the monosaccharide lipid was investigated by OSBORN & YUAN<sup>35</sup>. The UDP-galactose transfers galactose-1-phos-

TABLE I

Incorporation of mannose, rhamnose and galactose into the cell envelope of the mutant deficient in UDP-galactose<sup>53</sup>

Radioactive nucleotide sugar added	Non-radioactive nucleotide sugar added	Incorporation (m $\mu$ moles)
GDP-mannose-C <sup>14</sup>	—	0.15
GDP-mannose-C <sup>14</sup>	UDP-gal	0.17
GDP-mannose-C <sup>14</sup>	TDP-rham	0.19
GDP-mannose-C <sup>14</sup>	UDP-gal + TDP-rham	2.70
TDP-rhamnose-C <sup>14</sup>	—	0.40
TDP-rhamnose-C <sup>14</sup>	GDP-man	0.40
TDP-rhamnose-C <sup>14</sup>	UDP-galactose	1.50
TDP-rhamnose-C <sup>14</sup>	GDP-man + UDP-gal	3.40
UDP-galactose-C <sup>14</sup>	—	5.3
UDP-galactose-C <sup>14</sup>	GDP-man	5.6
UDP-galactose-C <sup>14</sup>	TDP-rham	8.7
UDP-galactose-C <sup>14</sup>	GDP-man + TDP-rham	8.0

phate to the lipid carrier with the release of UMP.

The di and trisaccharide lipid intermediates were characterized simultaneously by WIENER et al.<sup>53</sup> and ROBBINS et al.<sup>6, 56</sup>. The former group used a mutant strain of *Salmonella typhimurium* and the latter, *Salmonella anatum* and *Salmonella newington*. In order to get the trisaccharide lipid it was absolutely necessary to incubate the reaction system at low temperature for a short time, otherwise no solvent extractable radioactive product could be detected. The extractable trisaccharide lipid was identified as mannosyl-rhamnosyl-galactosyl-1-phosphate after extraction, electrophoresis, phosphatase treatment, hypoiodite oxidation and hydrolysis. Following the same procedure, HEATH et al.<sup>11, 12, 15</sup> detected the presence of a lipid carrier in the biosynthesis of *Escherichia coli* O-111 side chains. EDSTROM & HEATH<sup>11</sup> isolated a tetra and a pentasaccharide lipid containing colitose.

Peptidoglycan biosynthesis has been extensively studied in *Staphylococcus aureus* and *Micrococcus lysodeikticus*. In the peptidoglycan synthesis, as in the case of polysaccharide, there was a lipid carrier. STROMINGER's group<sup>1</sup> showed a cyclic mechanism involving 2 lipid intermediates: Muramyl-N-

-acetyl (pentapeptide)-P-P-phospholipid and N-acetylglucosamine-N-muramyl (pentapeptide)-P-P-phospholipid bound to enzymes. Both intermediates had been extracted by n-butyl alcohol, purified on diethyl aminoethyl cellulose and silicic acid columns<sup>7, 21</sup>.

The occurrence of lipid linked intermediates has been described in the biosynthesis of other bacterial polysaccharides. TROY & HEATH<sup>50</sup> reported the participation of lipid linked intermediates in the biosynthesis of capsular polysaccharide of *Aerobacter aerogenes*. SCHER et al.<sup>44</sup> determined the formation of mannosyl-lipid intermediates in the polymer mannan of *M. lysodeikticus* membrane.

STROMINGER's group<sup>1</sup> suggested that the occurrence of these lipid intermediates explains the utilization of intracellular nucleotide precursors for the synthesis of an extracellular compound, the lipopolysaccharide being outside of the permeability barrier. The linkage of the sugar to a membrane bound lipid could be a way of sugar transport through the membrane.

### 3. Identification of the carrier lipid.

The presence of a carrier was first described in the biosynthesis of peptidoglycan

of Gram positive organisms<sup>21, 48</sup>. The lipodic compound was separated by mild acid hydrolysis and analysed by mass spectroscopy. It was identified as a C<sub>55</sub> polyisoprenoid alcohol. Inhibition of peptidoglycan synthesis was obtained using ristocetin and vancomycin<sup>1</sup>.

There is some indication that the lipid carrier in the biosynthesis of endotoxin side chains is similar to that found in peptidoglycan synthesis. The carrier lipids of *Salmonella typhimurium* and *M. lysodeikticus* were indistinguishable in reactions involving monosaccharide phosphate intermediates<sup>31</sup>.

#### 4. Formation of the polymer.

The trisaccharide lipid intermediate was described in a system consisting of a particulate fraction plus nucleotide sugars incubated at low temperature. When the reaction mixture was warmed to 37°C, most of the label was not extractable in organic solvents.

when CDP-abequose was added with or after GDP-mannose, if the reaction with abequose was carried out at low temperature, to prevent polymerization. No abequose incorporation was found after trisaccharide polymerization. It was interesting to find the formation of polymer in the absence of abequose, but the polymerization of the tetrasaccharide is more rapid than that of the trisaccharide<sup>36</sup>.

The polymerized compound can be quantitatively recovered after phenol-water extraction. The derivative is macromolecular and polydisperse. Similar results were obtained simultaneously by ROBBIN's group<sup>56</sup> in preparations of *Salmonella anatum*.

Although the polymerized side chains are assumed to be transferred to the "R" core, this reaction cannot be demonstrated in the system studied<sup>27, 54</sup> because of the incompleteness of the core<sup>25</sup>.

BRAY & ROBBINS<sup>4</sup> and ROBBINS et al.<sup>38</sup> postulated the possible mechanisms of elongation of repeating units. In one scheme,

TABLE II  
Addition of mannose to preformed disaccharide intermediate<sup>54</sup>

Nucleotide sugar disaccharide intermediate label	Radioactive sugar content					
	GDP-mannose		GDP-mannose		GDP-mannose-C <sup>14</sup>	
	Galactose-C <sup>14</sup>		Rhamnose-C <sup>14</sup>		None	
	Total	CHCl <sub>3</sub> - MeOH Soluble	Total	CHCl <sub>3</sub> - MeOH Soluble	Total	CHCl <sub>3</sub> - MeOH Soluble
Incubation 5 min. at 10°C	152.0	16.0	24.0	17.0	15.2	11.0
Incubation 15 min. at 37°C	155.0	—	22.8	4.5	20.0	3.8

The product obtained after incorporation of mannose to the disaccharide at 37°C is indistinguishable from the product obtained with the simultaneous incubation of the particulate fraction with all 3 nucleotides.

The polymerization of the trisaccharide can occur in the absence of abequose, but the incorporation of abequose is dependent on the presence of UDP-galactose, TDP-rhamnose and GDP-mannose. Some Authors<sup>37, 54</sup> found that abequose incorporation occurred

the repeating monomer would be added to the non-reducing end of the growing chain. Another possibility would be the addition of the unit polymer to the non-reducing end of the monomer.

Pulse label experiments suggest the possible transfer of the polymer to the carrier lipid monomer exactly as proposed in the mechanism of protein synthesis<sup>25</sup>.

The incorporation of the polymerized product into lipopolysaccharide was dependent

on the addition of an exogenous acceptor containing a complete core, which implies in the existence of a ligase type enzyme. The absence of a complete core in *S. typhimurium* G-30 preparations<sup>26</sup> was responsible for the non-attachment of the polymer to form the "O" antigen molecule as shown in Figure 1.

#### METABOLIC CONTROL

Metabolic control can be exerted at either or both stages of lipopolysaccharide biosynthesis: at the level of precursors, nucleotide sugars or in the synthesis of the macromolecule itself.

Due to polysaccharide biosynthesis blockage, some species accumulate nucleotide sugars in the medium, while in other groups of bacteria there is no accumulation since feed back control is operative.

The absence of uridine nucleotide accumulation in some Gram positive penicillin treated organisms was attributed to feed back control<sup>48</sup>. In *Salmonella* rough strains, the accumulation of nucleotide sugars was determined under special conditions.

The structure of polysaccharide, as well as the rate of its synthesis, is genetically controlled.

NIKAIKO & NIKAIKO<sup>26, 28</sup> reported that in *Salmonella* all the enzymes involved in the synthesis of mannose, rhamnose and abequose are clustered in the "O" locus located very close to the histidine locus. Similar results were obtained with *Salmonella typhimurium* LT2 using recombination experiments<sup>47, 48</sup>.

The lack of sufficient experimental work in this area however precludes a clearer understanding of the actual control mechanisms.

#### RESUMO

#### *Biosíntese da cadeia lateral do antígeno "O" de Salmonella typhimurium*

O lipopolissacarídeo é o principal componente da parede celular das bactérias Gram negativas. Este envoltório celular tem particular importância para os membros da família *Enterobacteriaceae*. A porção polissacáridica da molécula é a responsável pela imunogenicidade. O polissacarídeo pode ser considerado em 3 partes: esqueleto, parte central e a cadeia lateral. A especificidade antigênica é determinada pela se-

quência e pelo número de açúcares da cadeia lateral. A biosíntese da macro-molécula tem sido extensivamente estudada por vários grupos de pesquisadores. Utilizando-se mutantes que têm o lipopolissacarídeo incompleto e baseando-se no conhecimento de que os extratos livres das células são capazes de incorporar açúcares a partir dos precursores, foi possível determinar a sequência dos açúcares da cadeia lateral de *Salmonella typhimurium* como sendo manose, ramnose e galactose com ramificação de abequose. Os estudos de incorporação, obtenção dos intermediários, assim como a caracterização, são discutidos. A macromolécula é formada pela polimerização dos intermediários ligados a um transportador de natureza lipídica. A união dos açúcares com o lípido ligado à membrana poderia ser uma maneira de transporte dos açúcares através da membrana. A natureza do lípido tem sido referida como sendo polisoprenóide de 55 átomos de carbono. O mecanismo de controle da biosíntese ainda não está elucidado.

#### ACKNOWLEDGMENT

I greatly appreciate Miss Lucy Miyauchi for her helpful assistance.

#### REFERENCES

- ANDERSON, J. S.; MATSUHASHI, M.; HASKIN, M. A. & STROMINGER, J. L. — Biosynthesis of the peptido-glycan of bacterial cell walls. II. Phospholipid carriers in the reaction sequence. *J. biol. Chem.*, **242**:3180-3190, 1967.
- BAGDIAN, G.; LUDEKIRZ, O. & STAUB, A. M. — Immunochemical studies on *Salmonella*. XI. Chemical modification correlated with conversion of group B *Salmonella* by bacteriophage 27. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:405-424, 1966.
- BECKMANN, I.; SUBBATAH, T. V. & STOCKER, B. A. D. — Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. II. Serological and chemical investigations. *Nature (Lond.)*, **201**:1299-1301, 1964.
- BRAY, D. & ROBBINS, P. W. — The direction of chain growth in *Salmonella anatum*. O antigen biosynthesis. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **28**:334-339, 1967.
- CHRISTENSON, J. G.; GROSS, S. K. & ROBBINS, P. W. — Enzymatic synthesis of the antigen carrier lipid. *J. biol. Chem.*, **244**:5436-5439, 1969.
- DANKERT, M.; WRIGHT, A.; KELLEY, W. S. & ROBBINS, P. W. — Isolation, purification and properties of the lipid-linked intermediates of O antigen biosynthesis. *Arch. Biochem.*, **116**:425-435, 1966.

7. DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. S. & WOOD, W. B. — *Microbiology*, 1st ed. New York, Harper & Brow, 1967. p. 114-121.
8. EDSTROM, R. D. & HEATH, E. C. — Sugar nucleotides transferases in *E. coli* lipopolysaccharide biosynthesis. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **16**:576-581, 1964.
9. EDSTROM, R. D. & HEATH, E. C. — Isolation of colitose containing oligosaccharides from the cell wall lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **21**:638-643, 1965.
10. EDSTROM, R. D. & HEATH, E. C. — The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. VI. Enzymatic transfer of galactose, glucose, N-acetyl glucosamine, and colitose into the polymer. *J. biol. Chem.*, **242**:3581-3588, 1967.
11. EDSTROM, R. D. & HEATH, E. C. — The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. VII. Studies on the structure of the O antigenic polysaccharide. *J. biol. Chem.*, **242**:4125-4133, 1967.
12. ELBEIN, A. D. & HEALTH, E. C. — The biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in *Escherichia coli*. I. The biochemical properties of a uridine diphosphate galactose-4-epimeraseless mutant. *J. biol. Chem.*, **240**:1919-1925, 1965.
13. GINSBURG, V. — Sugar nucleotides and the synthesis of carbohydrates. *Advanc. Enzymol.*, **26**:35-88, 1964.
14. HAMMERLING, G.; LÜDERITZ, O. & WESTPHAL, O. — Structural investigations on the core polysaccharide of *Salmonella typhimurium* and the mode of attachment of the O-specific chains. *Eur. J. Biochem.*, **15**:48-56, 1970.
15. HEATH, E. C.; MAYER, R. M.; EDSTROM, R. D. & BEAUDREAU, C. A. — Structure and biosynthesis of lipopolysaccharide of *Escherichia coli*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:315-333, 1966.
16. HORECKER, B. L. — The biosynthesis of bacterial polysaccharides. *Ann. Rev. Microbiol.*, **20**:253-290, 1966.
17. KABAT, E. A. — *Structural concepts in immunology and immunochemistry*. New York, Holt, Rinehart & Winston, 1968. p. 119-142.
18. LÜDERITZ, O.; GALANOS, C.; RISSE, H. J.; RUSCHMANN, E.; SCHLECHT, S.; SCHMIDT, G.; SCHULTE-HOLTHAUSEN, H.; WHEAT, R.; WESTPHAL, O. & SCHLOSSHARDT, J. — Structural relationships of *Salmonella* O and R antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:349-374, 1966.
19. LÜDERITZ, O.; RUSCHMANN, E.; WESTPHAL, O.; RAFF, R. & WHEAT, R. — Occurrence of 3-amino-3,6-dideoxyhexoses in *Salmonella* and related bacteria. *J. Bact.*, **93**:1681-1687, 1967.
20. LÜDERITZ, O.; STAUB, A. M. & WESTPHAL, O. — Immunochemistry of O and R antigens of *Salmonella* and related Enterobacteriaceae. *Bact. Rev.*, **30**:193-255, 1966.
21. MANDELSTAN, J. & MCQUILLEN, K. — *Biochemistry of bacterial growth*. New York, Blackwell Sci. Public., 1968. p. 73-135.
22. MAYER, R. M.; EDSTROM, R. D. & HEATH, E. C. — Biosynthesis and structure of the cell wall lipopolysaccharide (LPS) of *Escherichia coli* 0111-B 4. *Fed. Proc.*, **24**:479, 1965.
23. MERGENHAGEN, S. E.; BLADEN, H. A. & HSU, K. E. — Electron microscopic localization of endotoxin lipopolysaccharide in Gram-negative organisms. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:279-291, 1966.
24. NEUFELD, E. F. & GINSBURG, V. — Carbohydrate metabolism. *Ann. Rev. Biochem.*, **34**:297-312, 1965.
25. NIKAIDO, H. — Biosynthesis of cell wall lipopolysaccharide in Gram-negative enteric bacteria. *Advanc. Enzymol.*, **31**:77-124, 1968.
26. NIKAIDO, H. — Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*-further studies on the linkage between O side chains and R core. *Eur. J. Biochem.*, **15**:57-62, 1970.
27. NIKAIDO, H.; NAIDE, Y. & MÄKELA, P. H. — Biosynthesis of O-antigenic polysaccharides in *Salmonella*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:299-314, 1966.
28. NIKAIDO, H. & NIKAIDO, K. — Biosynthesis of cell wall polysaccharide in mutant strain of *Salmonella*. IV. Synthesis of S-specific side chain. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **19**:322-327, 1965.
29. OSBORN, M. J. — Studies on the Gram-negative cell wall. I. Evidence for the role 2-keto-3-deoxyoctonate in the lipopolysaccharide of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **50**:499-506, 1963.
30. OSBORN, M. J. — Biosynthesis and structure of the core region of the lipopolysaccharide in *Salmonella typhimurium*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:375-383, 1966.
31. OSBORN, M. J. — Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Biochem.*, **38**:501-538, 1968.
32. OSBORN, M. J. & D'ARI, L. — Enzymatic incorporation of N-acetylgucosamine into cell wall lipopolysaccharide in a mutant strain. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **16**:568-575, 1964.
33. OSBORN, M. J.; ROSEN, S. M.; ROTHFIELD, L. & HORECKER, B. L. — Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. I. Enzymatic incorporation of galactose in a mutant strain of *Salmonella*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **48**:1831-1838, 1962.

35. OSBORN, M. J. & YUAN, T. Y. R. — BioFIELD, L.; ZELEZNICK, L. D. & HORECKER, B. L. — Lipopolysaccharide of the Gram-negative cell wall. *Science*, **145**: 783-789, 1964.
35. OSBORN, M. J. & YUAN, T. Y. R. — Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. VII. Enzymatic formation of the first intermediate in biosynthesis of the O-antigen of *Salmonella typhimurium*. *J. biol. Chem.*, **243**:5145-5152, 1968.
36. OSBORN, M. J. & WEINER, I. M. — Mechanism of biosynthesis of the lipopolysaccharide of *Salmonella*. *Fed. Proc.*, **26**:70-76, 1967.
37. OSBORN, M. J. & WEINER, I. M. — Biosynthesis of a bacterial lipopolysaccharide. VI. Mechanism of incorporation of abequose into the O-antigen of *Salmonella*. *J. biol. Chem.*, **243**:2631-2639, 1968.
38. ROBBINS, P. W.; BRAY, D.; DANKERT, M. & WRIGHT, A. — Direction of chain growth in polysaccharide synthesis. *Science*, **158**:1536-1542, 1967.
39. ROBBINS, P. W. & UCHIDA, T. — Chemical and macromolecular structure of O antigens from *S. anatum* strains carrying mutants of bacteriophage E15. *J. biol. Chem.*, **240**:375-383, 1965.
40. ROTHFIELD, L.; OSBORN, M. J. & HORECKER, B. L. — Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. II. Incorporation of glucose and galactose catalysed by particulate and soluble enzymes in *Salmonella*. *J. biol. Chem.*, **239**:2788-2795, 1964.
41. ROTHFIELD, L. & TAKESHITA, M. — The role of cell envelope phospholipid in the enzymatic synthesis of bacterial lipopolysaccharide-lipid complex. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **20**:521-527, 1965.
42. SALTON, M. R. J. — Studies of bacterial cell wall. VII. Monosaccharide constituents of the walls of Gram-negative bacteria. *Biochem. biophys. Acta*, **45**:364-371, 1960.
43. SALTON, M. R. J. — Structure and function of bacterial cell membranes. *Ann. Rev. Microbiol.*, **21**:417-442, 1967.
44. SCHER, M.; LENNARZ, W. J. & SWEENEY, C. C. — The biosynthesis of mannosyl-1-phosphoryl polyisoprenol in *Micrococcus lysodeikticus* and its role in mannan synthesis. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **59**: 1313-1320, 1968.
45. SHANDS, J. W. — Localization of somatic antigen on Gram-negative bacteria using ferritin antibody conjugates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:292-298, 1966.
46. SIMMONS, D. A. R.; LÜDERITZ, O. & WESTPHAL, O. — The immunochemistry of *Salmonella* chemotype VI O antigens. a) The structure of oligosaccharides from *Salmonella* group G (013,22) lipopolysaccharides; b) The structure of oligosaccharides from *Salmonella* group N (030) lipopolysaccharides; c) The structure of oligosaccharides from *Salmonella* group U (043) lipopolysaccharide. *Biochem. J.*, **97**:807-826, 1965.
47. STOCKER, B. A. D.; WILKINSON, R. G. & MAKELA, P. H. — Genetic aspects of biosynthesis and structure of *Salmonella* somatic polysaccharide. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:334-348, 1966.
48. STROMINGER, J. L. — In GUNSLAS, I. C. & STANIER, R. Y. — *The bacteria*. New York, Academic Press, 1962. p. 413.
49. SUBBALAH, T. V. & STOCKER, B. A. D. — Rough mutants of *Salmonella typhimurium*. *Nature (Lond.)*, **201**:1298, 1964.
50. TROY, F. A. & HEATH, E. C. — A lipid intermediate in the biosynthesis of the capsular polysaccharide (CP) of *Aerobacter aerogenes*. *Fed. Proc.*, **27**:345, 1968.
51. UCHIDA, T.; MAKINO, T.; KURAHASHI, K. & UETAKE, H. — Biosynthesis of the determinant 34 of the *Salmonella* O antigen. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, **21**: 354-360, 1965.
52. UETAKE, H.; NAKAGAWA, T. & AKIBA, T. — The relationship of bacteriophage to antigenic changes in group E *Salmonellas*. *J. Bact.*, **69**:571-579, 1955.
53. WEINER, I. M.; HIGUCHI, T.; ROTHFIELD, L.; SALTMARSH, M.; OSBORN, M. J. & HORECKER, B. L. — Biosynthesis of bacterial lipopolysaccharide. V. Lipid linked intermediates in the biosynthesis of the O antigen groups of *Salmonella typhimurium*. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**:228-235, 1965.
54. WEINER, I. M.; HIGUCHI, T.; OSBORN, M. J. & HORECKER, B. L. — Biosynthesis of O-antigen in *Salmonella typhimurium*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **133**:391-404, 1966.
55. WESTPHAL, O. & JANN, K. — Bacterial lipopolysaccharides. Extraction with phenol-water and further applications of the procedure. In R. L. WHISTLER, ed., *Methods in carbohydrate chemistry*. New York, Academic Press, 1965. v. 5, p. 83-91.
56. WRIGHT, A.; DANKERT, M.; FENESSEY, P. & ROBBINS, P. W. — Evidence for an intermediate stage in the biosynthesis of the *Salmonella* O antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **54**:235-241, 1965.
57. YUASA, R.; NAKANE, K. & NIKAIKO, H. — Structure of cell wall lipopolysaccharide from *Salmonella typhimurium*. Structure of lipopolysaccharide from a semirough mutant. *Eur. J. Biochem.*, **15**:63-71, 1970.

Received for publication em 23/4/1971.



**Eficácia e Segurança!**

*o que o médico deseja para  
o tratamento de seus pacientes  
com infecções bacterianas:*

# VERSATREX

(hetacilina Bristol)

**Modo de Usar:**

**Crianças com menos de 40 quilos:** - Dose média de 25 a 50mg por quilo de peso ao dia, dividida em 4 tomadas. Doses maiores serão necessárias de acordo com a infecção.

**Adultos (e crianças com mais de 40 quilos):** - Dose média: 250 a 500mg cada 6 horas.

**Apresentações:**

Cápsulas de 250mg e de 500mg: - caixas com 8 e 48 cápsulas.

Injetável com 250mg, 500mg e 1g - frasco ampola com diluente.

Pediátrico: Pó para 30 e 60cm<sup>3</sup> de suspensão com 125mg por 5cm<sup>3</sup>.



**LABORTERAPICA-BRISTOL S.A.**

Ind. Quím. e Farm. - R. Carlos Gomes, 924 (Sto. Amaro) - S.P.

# OXOID

## AGAR BACTERIOLÓGICO

N.º 1

- óticamente claro
- livre de opalescência
- não precipita
- não flocla
  
- excepcional rendimento
- 9 g p/litro

MEIOS  
DE CULTURA  
DE  
ALTA QUALIDADE

## MULTODISCOS PARA

### ANTIBIOGRAMAS

- seleção racional  
dos agentes
  
- práticos e  
econômicos

## GRANDE VARIEDADE PARA PRONTA ENTREGA

### PREÇOS CONVENIENTES

#### D. S. T. AGAR BASE

- seguramente o mais  
indicado para  
antibiogramas
  
- não impede a difusão  
de antibióticos,  
sulfonamidas e  
antissépticos urinários.

SOLICITEM-NOS

LITERATURA

CONSULTEM-NOS

SEMPRE

#### C. L. E. D. MEDIUM

novidade em bacteriologia  
urinária

fácil identificação  
de 10 germes  
patogênicos

Distribuidora exclusiva:

## Companhia Equipadora de Laboratórios Modernos



Rua Barata Ribeiro, 369 — Caixa Postal 4022  
Fones: 256-0508 / 256-1682 / 256-9848 / 257-1831  
SÃO PAULO — SP

Edanee - Imprimiu  
São Paulo