

Revista de Microbiologia



SBM

Sociedade
Brasileira de
Microbiologia

São Paulo — Brasil

Volume 20 Número 4 Out.-Dez. 1989

Instruções aos autores

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

PROGRAMA DE APOIO A PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

MCT



CNPq



finep



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

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

Diretor Executivo Walderez Gambale
Instituto de Ciências Biomédicas USP
Deptº de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374
Cidade Universitária USP
05508 São Paulo - SP

Diretores Associados Bacteriologia Maria Therezinha Martins
Micologia Claudete Rodrigues Paula
Virologia Maria Lúcia Racz

Assistente de Diretoria Maria Helena Colón Silva (SBM)

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

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

Datilografia Deborah Maria da Conceição (SBM)

Impressão PRODICAFI Gráfica e Editora Ltda.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Diretoria	Presidente Maria Therezinha Martins Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP	Vice-Presidente Walderez Gambale Inst. de Ciências Biomédicas - USP Deptº de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP
	Secretária Geral Lúcia Martins Teixeira Inst. de Microbiologia - UFRJ Centro de Ciências da Saúde - Bl.1 Ilha do Fundão 21944 - Rio de Janeiro - RJ	Tesoureiro Leonardo Perego Jr. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP Conjunto das Químicas Cidade Universitária 05508 - São Paulo - SP
Coordenadores de Programas da SBM	Microbiologia de Alimentos (Sebastião Timó Laria - ICB/USP-SP); Microbiologia Clínica (Sergio E. Longo Fracalanza - UFRJ-RJ); Microbiologia Industrial (Leonardo Perego Jr. - FCF/USP-SP); Microbiologia Ambiental (Maria Therezinha Martins - ICB/USP-SP); Micologia (Benedito Corrêa - ICB/USP-SP); Leveduras (Cláudete Rodrigues Paula - ICB/USP-SP); Microbiologia do Solo (Ely Nahas - UNESP-Jaboticabal-SP); Micotoxinas (Mirna Sábio - IAL-SP); Infeções Hospitalares (Carlos Emílio Levy - FMRP).	
Objetivos	A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, a cada dois anos, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.	
Endereço	Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP Brasil Fone: (011) 813-9647 TELEX 11 35085	

REVISTA DE MICROBIOLOGIA
PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
VOLUME 20 OUTUBRO-DEZEMBRO 1989 NÚMERO 4
REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 20(4)

CONTEÚDO-CONTENTS

	PAG.
Modolo, J.R.; Bisping, W. & Kirpal, G. Suscetibilidade "in vitro" de <i>Campylobacter</i> isolado de bezerros contra 22 antimicrobianos "In vitro" drug susceptibilities of <i>Campylobacter</i> isolated from calves against 22 antimicrobial agents	391
Caetano-Piscottano, M.N.; Alves, A.J.; Simeon de Buochberg, M.; Attisso, M.; Zuccarelli, M. & Dusart, G. Atividade de três ureidopenicilinas sobre bacilos gram negativos isolados no Recife Activity of three ureidepenicillins on Gram negative bacillus isolated in Recife	396
Corrêa, I. & Hofling, J.F. Avaliação da ação antimicrobiana de dois desinfetantes hospitalares Antimicrobial action evaluation of two Hospital disinfectants	402
Zucato, M.R.L.; Castro, A.F.P. de; Ricci, L.C. & Costa M.G. Estudo em camundongos (CBA x C57B1/10) F1 da influência da enterotoxina termoestável (STA) de <i>Escherichia coli</i> na fagocitose Study in mice (CBA x C57B1) F1 of the influence of thermostable (STA) enterotoxins from <i>Escherichia coli</i> in phagocytosis	411
Rosado, A.S.; Silva, K.R.A. da; Rocha Seixas, R.L. da; Miguel, M.A.L. & Oliveira Tórtora, J.C. de Intoxicação por <i>Staphylococcus aureus</i> provocada por carne de peru defumada	419
Petri, C.M.; Antunes, L.A.F. & Saridakis, H.O. <i>Escherichia coli</i> em produtos cárneos comercializados em Londrina - PR. I - Frequência de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC) <i>Escherichia coli</i> in meat products commercialized in Londrina - PR. I - Frequency of classical enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	421
Petri, C.M.; Antunes, L.A.F. & Saridakis, H.O. <i>Escherichia coli</i> em produtos cárneos comercializados em Londrina - PR. II - Frequência de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigênicas (ETEC) <i>Escherichia coli</i> in meat products commercialized in Londrina - PR. II - Frequency of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	427
Leite, C.Q.F.; Ferracini Júnior, R.; Falcão, D.P.; David, H. & Frébault, V.L. Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do Estado de São Paulo - Brasil Prevalence and distribution of mycobacteria in water of some regions of São Paulo State - Brazil	432
Yanaguita, R.M.; Barbosa, A.D.; Silva, L.A. & Gilio, A.E. Emprego do método de co-aglutinação na detecção de enteroxina termolábil (LT) de <i>Escherichia coli</i> Use of co-agglutination test for detection of enterotoxin LT from <i>Escherichia coli</i>	442
Brito, M.E.F. de; Brasil, D.P.; Almeida, C.R. de & Almeida, A.M.P. de Emprego do teste de imunofluorescência no diagnóstico da peste (infecção	

pela <i>Yersinia pestis</i>) nos focos do Nordeste do Brasil Use of immunofluorescent antibody test in the plaque diagnosis in the foci of the Brazil	446
Nahas, E.; Assis, L.C. de & Zanon, J.C. Liberação das fosfatases ácida e alcalina repressíveis de <i>Neurospora crassa</i> por detergentes e sais Elution of repressible acid and alkaline phosphatases from <i>Neurospora crassa</i> by detergents and salts	452
Chaves, V.M.G.; Silva, D.O.; Brune, W. & Moreira, M.A. Atividades celulolíticas de <i>Humicola</i> sp Cellulolytic activities of <i>Humicola</i> sp	460
Pasqual, M.S.; Carrau, J.L. & Moyna, P. Estudos sobre a inibição seletiva de leveduras de uso enológico por alcalóides Studies on the use of alkaloids for the selective inhibition of wine yeasts	466
Chaves, V.M.G.; Silva, D.O.; Brune, W. & Moreira, M.A. Caracterização do fungo <i>Humicola</i> sp termo-celulolítico isolado de composto Caracterization of a thermophilic and cellulolytic <i>Humicola</i> sp isolated from compost	470
Carvalho, Y. & Milanez, A.I. Efeitos da temperatura e umidade do solo sobre <i>Pythium splendens</i> Effects of soil temperature and moisture on <i>Pythium splendens</i> Braun	477
Paula, C.R.; Purchio, A.; Gambale, W.; Corrêa, B. & Costa Pires, M.F. Aspectos biológicos das fases filamentosa e leveduriforme de <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	483
Cury, A.E.; Sampaio, M.C.C.; Birman, E.G. & Paula, C.R. Atividade de anti-sépticos contra leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes com câncer de boca antes e durante a radioterapia	490
Neto, E.A.; Pignatari, A.C.C.; Castelo Filho, A.; Colombo, A.L.; Longo, J.C. & Camargo, Z.P. Micetoma eumicótico: Relato de um caso por <i>Madurella grisea</i> Eumycotic mycetoma: Report of a case caused by <i>Madurella grisea</i>	495
Goldman, G.H.; Queiroz, M.V.; Costa, C. & Azevedo, J.L. de Isolamento, regeneração e condição nuclear em protoplastos de uma linhagem celulolítica de <i>Aspergillus niger</i> Isolation, regeneration and nuclear condition in protoplasts of a cellulolytic strain of <i>Aspergillus niger</i>	501
Informação Técnico-Científica SBM	507

SUSCETIBILIDADE "IN VITRO" DE CAMPYLOBACTER ISOLADO DE BEZERROS CONTRA 22 ANTIMICROBIANOS

José Rafael Modolo

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

W. Bisping
& G. Kirpal

Instituto de Microbiologia e Epidemiologia
Veterinária de Hannover R.F.A.
Bischofsholer Dann 15
3000 Hannover 1 R.F.A.

Resumo

Foram realizados testes de suscetibilidade em 60 estirpes de *Campylobacter* isoladas de conteúdo intestinal (reto, íleo e colo) de bezerros com e sem diarréia. As estirpes classificadas como *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter jejuni/coli*, *Campylobacter coli*, NARTC-grupo e *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis* apresentaram sensibilidade entre 90% a 97% à gentamicina, nitrofurantoina, neomina, apramicina e canamicina. Apresentaram resistência entre 88% a 100% contra o sulfametoxazol-trimetoprim, à bacitracina, vancomicina e penicilina e contra as 13 drogas restantes testadas a resistência das estirpes situou-se entre 75% a 13%. A variação na suscetibilidade das estirpes de *Campylobacter* frente as drogas antimicrobianas sugere a utilização de testes de sensibilidade para eleição de drogas a serem utilizadas no tratamento da *Campylobacter*-infecção.

Introdução

Campylobacter é infecção intestinal aguda que acomete o homem e animais vertebrados. No homem ela é apontada como grave infecção intestinal, por vezes fatal em crianças (3). Entretanto, infecção extra-intestinal tem sido descrita como meningite (24); artrite séptica (16); pericardite (15); tromboflebite (13) e aborto (17). Pesquisas epidemiológicas demonstram que uma das fontes de infecção do *Campylobacter* é o animal doméstico, como por exemplo o cão (8). Carcaças de aves destinadas ao consumo humano podem estar até 100% contaminadas por *Campylobacter jejuni* (9). Essa última observação vale para suínos e seus sub-produtos (11). Levy

(20) foi o primeiro a suspeitar, em 1946, que *Campylobacter* sp (Vibrio) pode ser transmitido ao homem através do leite não pasteurizado. O "Center for Disease Control" (6) noticiou que 54% da *Campylobacter*-infecção aguda no homem, no Colorado, tinha como veículo do agente de infecção o leite bovino não pasteurizado. Das 56% de escolares da Pennsylvania com grave *Campylobacter*ose aguda tinham também bebido leite bovino "in natura" (4). Dos dois surtos de *Campylobacter*-gastroenterite ocorridos no homem, na Inglaterra, 48% eram crianças que haviam bebido leite não pasteurizado (28). Lander & Gill (18) noticiaram a ocorrência de mastite bovina causada por esse agente. Alguns autores têm apontado possibilidades

Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia e Epidemiologias Veterinárias da Escola Superior de Medicina Veterinária de Hannover, com recursos do "Deutscher Akademischer Austauschdienst" DAAD. RFA - 1982 a 1985.

terapêuticas, pelos resultados de sensibilidade do *Campylobacter*, a drogas antimicrobianas. Anthony & col. (1) por exemplo, encontraram relativa resistência desse microrganismo à penicilina e às cefalosporinas e total sensibilidade à tetraciclina e aos aminoglicosídeos. Os resultados obtidos por Hasselbach & col. (19) revelaram que os microrganismos do gênero *Campylobacter* apresentaram 100% de sensibilidade à gentamicina e à neomicina e total resistência à penicilina. Karmali & col. (14) e Weber & col. (27) encontraram resultados divergentes em relação a sensibilidade do *Campylobacter* à eritromicina e Butzler & col. (5) encontraram amostras de *Campylobacter* com relativa resistência à penicilina às cefalosporinas e à vancomicina; opondo-se os resultados com relação à tetraciclina, gentamicina e à amicacina.

O objetivo do trabalho é oferecer subsídios à terapêutica da *Campylobacter*-infecção, verificando a susceptibilidade, "in vitro" contra 22 drogas antimicrobianas de 60 estirpes de *Campylobacter* isoladas de bezerros com e sem diarréia, considerando que a *Campylobacter*ose é tida como grave zoonose e sendo esse agente um dos causadores de diarréia no homem e nos bovinos (8, 12).

Material e Métodos

1. Origem da amostra e isolamento do *Campylobacter*: As fezes do reto foram coletadas a diferentes locais ao redor da cidade de Hannover e o conteúdo intestinal de secções do íleo e colo, durante as necropsias realizadas no Instituto de Patologia Veterinária, durante 1983 a 1984. Os conteúdos intestinais foram semeados diretamente em ágar-sangue com suplemento antibiótico de Butzler (Oxoid SR85). A seguir 1g de material fecal foi suspenso em 9ml de solução fisiológica, centrifugada e filtrada através de filtros de acetato de celulose com 0,65 µ de diâmetro. Do filtrado, cinco gotas foram semeadas em placas com ágar tioglicolato. As placas de tioglicolato foram incubadas a 37°C e as seletivas de Butzler a 43°C, por 72 horas, com mistura

atmosférica de 1800ml de H₂ e 350ml CO₂ (22).

2. Diferenciação bioquímica: As 60 estirpes de *Campylobacter* isoladas do conteúdo intestinal dos bezerros foram testadas frente as seguintes provas bioquímicas: prova de catalase; crescimento a 25°C e a 43°C; crescimento em meio com 3,5% de NaCl; produção de H₂S em meio; com e sem cisteína; redução do selenito de sódio; hidrólise do hipurato; resistência ao ácido nalidíxico; tolerância ao 2'3'5 cloreto de trifenil tetrazólio; tolerância a diferentes concentrações de glicina. Dentro dos critérios propostos foram classificados 53,3% como *Campylobacter jejuni* (biotipo 1 e biotipo 2); 8,4% como *Campylobacter coli*; 20% como *Campylobacter jejuni/coli*; 15% como "Nalidixic Acid Resistant Thermophilic *Campylobacter* (NARTC-grupo)" e 3,3% como *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* (23).

3. Teste de suscetibilidade: As 60 estirpes foram liofilizadas e estocadas para também serem submetidas aos testes de sensibilidade a drogas. Após a hidratação das amostras, essas foram semeadas em meio líquido (extrato de carne, peptona, NaCl e 0,08% de agar) e incubadas a 37°C por 72 horas. Desse crescimento, três a cinco gotas foram semeadas em placas de DST-ágar (Oxoid) e incubadas em atmosfera com 1800ml de H₂ e 350ml de CO₂, (envelopes Oxoid), a 37°C por 72 horas. As interpretações dos resultados foram feitas mediante halo de inibição do crescimento em: sensível (S) e resistente (R). Os 22 discos utilizados para o teste de suscetibilidade encontram-se no Quadro 1.

Resultados e Discussão

A suscetibilidade de 60 estirpes de *Campylobacter* frente as 22 drogas antimicrobianas testadas demonstraram sensibilidade populacional entre 97% (58 estirpes) a 90% (54 estirpes) à gentamicina, nitrofurantoina, neomicina, apramicina e à canamicina. Apresentaram contra o sulfametoazol-trimetoprim, à bacitracina, vancomicina e à

Quadro 1 - Suscetibilidade de 600 estirpes* de *Campylobacter* contra 22 drogas antimicrobianas, Hannover, 1982 - 1985.

Símbolos: * *Campylobacter jejuni* = 32 estirpes; *Campylobacter coli* = 5 estirpes; *Campylobacter fetus* subsp *venerealis* = 2 estirpes; *Campylobacter jejuni/coli* = 12 estirpes e NARTC-grupo = 9 estirpes.

D r o g a s	ug	<i>C. jejuni</i>		<i>C. jejuni/coli</i>		<i>C. coli</i>		NARTC-grupo		<i>C. f. venerealis</i>	
		S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
gentamicina	10	94	6	100		100		100		100	
nitrofurantoina	200	100		100		100		78	22	100	
neomicina	30	100		100		100		78	22	100	
apramicina	15	97	3	92	8	88	20	100		100	
canamicina	30	97	3	75	25	80	20	89	11	100	
sulfametoxazol-trimetoprim	25	6	94	42	58	20	80	100		100	
bacitracina	10	6	94	8	92	20	80	100		100	
vancomicina	30		100	17	83	100		100		100	
penicilina	15u.i.		100		100	100		100		100	
clortetraciclina	10	91	9	83	17	100		67	33	100	
furazolidona	100	94	6	58	42	100		89	11	100	
cloranfenicol	10	75	25	67	33	80	20	89	11	100	
espectan	25	75	25	58	42	80	20	89	11	100	
estreptomicina	10	84	16	67	33	80	20	56	33		100
eritromicina	10	91	9	33	67	80	20	33	77	100	
oleandomicina	15	84	16	58	42	20	80	56	44	100	
sulfonamida	100	78	22	8	92	40	60	22	78	100	
polimixina-B	100u.i.	47	53	25	75	60	40	33	77	100	
ampicilina	25	37	63	25	75	60	40	22	78	100	
cefaloridina	30	25	75	33	67	40	60	22	78	100	
lincomicina	15	41	59	17	83	20	80	100		100	
tilosina	30	13	87	25	75	60	40	56	44	100	

penicilina, sensibilidade populacional variando entre 12% (7 estirpes) a 0%, ou resistência entre 88% (53 estirpes) a 100% e, contra as 13 drogas restantes testadas, apresentaram resistência populacional entre 75% (45 estirpes) a 13% (8 estirpes) (Quadro 1). Os resultados com relação a sensibilidade ao cloranfenicol, à gentamicina, estreptomicina e à tetraciclina coincidem com os resultados de Butzler & col. (5); divergindo desse autor a atividade da eritromicina, neomicina e da canamicina. Com relação a atividade da eritromicina, Karmali & col. (14) encontraram resistência em 1% e Weber & col. (27) resistência em 60% das amostras de *Campylobacter* sp testadas. No presente experimento a resistência populacional encontrada à esse antibiótico foi em 13% (8 estirpes). Frente à clortetraciclina, os resultados são divergentes para os dos achados de Anthony & col. (1), quando no uso de tetraciclinas. A sensibilidade populacional das

estirpes de *Campylobacter* isoladas frente à gentamicina e à neomicina são também confirmados por Rubsamen & col. (26). Butzler & col. (5), recomendam a gentamicina como droga de eleição para o tratamento da Campylobacterose, possibilidade essa que é reforçada pelos resultados do trabalho desenvolvido pois, foi encontrada sensibilidade à gentamicina em 97% (58 estirpes). A grande variação na suscetibilidade de *Campylobacter* isolados frente as diferentes drogas antimicrobianas foram também verificadas por Rubsamen & col. (26) e por Primavesi (25). Hasselbach & col. (10), por exemplo, encontraram amostras de *Campylobacter* cuja resistência populacional a 26 drogas variou entre 2% a 94%. Alguns fatores poderiam ser considerados para tentar explicar a variação encontrada na suscetibilidade de *Campylobacter* a drogas antimicrobianas. O próprio aumento da resistência de microrganismos a diferentes princípios ativos dos medicamentos usados na terapia ou na

profilaxia poderia oferecer, por pressão seletiva, a ocorrência do mutante resistente. Outro fator importante da resistência desse agente a diferentes medicamento é a ocorrência de plasmídeos de resistência contra ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, canamicina, neomicina, penicilina, estreptomicina, sulfametoxazol-trimetropim e contra tetraciclina, devendo-se considerar também a capacidade desse microrganismo em produzir β -lactamase; sendo encontrada essa enzima em 82%, 89,3% e 92,5% de amostras de *Campylobacter* (2, 7, 19, 21).

A verificação na variação da suscetibilidade das estirpes de *Campylobacter* frente as 22 drogas antimicrobianas testadas nesse experimento e as possibilidades dos fatores de resistência do agente a diferentes princípios ativos de medicamentos apresentados pelos autores citados, sugere que a *Campylobacteriose* deva ser tratada mediante drogas de eleição fornecidas por testes de sensibilidade.

Summary

"In vitro" drug susceptibilities of Campylobacter isolated from calves against 22 antimicrobial agents

The "in vitro" drug susceptibilities of 60 *Campylobacter* strains isolated from stools of either, diarrheic and non-diarrheic calves were investigated against 22 antimicrobial agents. The isolates classified as *Campylobacter jejuni*, *C. jejuni/coli*, *C. coli*, NARTC-groups and *C. fetus* subsps. *venerealis*, showed high sensitivity to gentamicyn, nitrofurantoin, neomycin, apramycin and kanamycin (90 - 97%), whereas to trimethoprim sulfametoxazole, bacitracin, vancomycin and penicilin, almost all strains were found resistant (88 - 100%). Otherwise, in relation to the remaining 13 drugs, the percentage of resistant strains varied from 13 - 75%. In view the wide range of the bacterial drug susceptibilities, the authors suggests the use of sensitivity tests for an suitable choice of the therapeutic agent in the

treatment of the *Campylobacter* infections.

Referências Bibliográficas

1. Anthony, W.; Chow, P.; Patten, V. & Bednorz, D. - Susceptibility of *Campylobacter fetus* to twenty - two antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother*, 13:416-618, 1978.
2. Austen, R.A. & Trust, T.J. - Detection of plasmids in the related group of the genus *Campylobacter*. *FEMS microbiol. Lett.*, 8:201-204, 1980.
3. Blasér, M.; Laforce, F.M.; Wilson, N.A. & Wang, W.L.L. - Reservoirs for human *Campylobacteriosis*. *J. Infect. Dis.*, 141:665-669, 1980.
4. Bundesgesundheitblatt - Zwei Ausbrüche von Lebensmittelvergiftungen durch *Campylobacter* in den USA. *Bundesgesundhblate*, 26:441, 1983.
5. Butzler, J.P.; Dekeyser, P. & Lanfontaine, T. - Susceptibility of related vibrios and vibrio fetus to twelve antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother*, 5:86-89, 1974.
6. Center for Disease Control - *Campylobacteriosis associated with raw milk consumption*, *Morb. & Wkly Rep.*, 32:337-344, 1983.
7. Fliegelman, R.M.; Petrak, R.; Goodman, L.J.; Segreti, J.; Trenholme, G.M. & Kaplan, R.L. - Comparative in vitro activities of twelve antimicrobial agents gains *Campylobacter* species. *Antimicrob. Agents Chemother*, 27:429-430, 1985.
8. Fox, J.G.; Moore, R. & Ackerman, J.I. - Canine and feline *Campylobacteriosis*: epizootiology and clinical and public health features. *J. Amer. Med. Ass.*, 183:1420-1424, 1983.
9. Hartog, B.J.; Wilde, G.J.A. & Boer, E. - Poultry as a source of *Campylobacter jejuni*. *Arch. Lebensmitt. - Hyg.*, 34:109-132, 1983.
10. Hasselbach, P.; Kirpal, G.; Gorgen, M. & Bisping, W. - Untersuchungen zum vorkommen von keimen der Gattung *Campylobacter* beim Schwein. Teil II: Kulturelles Verhalten, Differenzierung und Resistenzprüfung der isolierten *Campylobacter*-stämme. *Berl. Munch. tierarztl. Wschr.*, 97:113-119, 1984.

11. Horbach, I.
Campylobacterenteritis:
Bundesgesundheitsblatt, 26:289-391,
1983.
12. Jones, F.S. & Little, P.B. - The
etiology of infections diarrhea
(winter scours) in cattle. *J. exp.*
Med., 53:835-843, 1931.
13. Kahler, R.L. & Sheldon, L. - *Vibrio*
fetus. *Infections in man. New Engl.*
J. Med., 262:1218-1222, 1960.
13. Karmali, M.A.; De Grandis, S. &
Fleming, P. - Antimicrobial
susceptibility of *Campylobacter*
jejuni with special reference to
resistance patterns of canadian
isolates. *Antimicrob. Agents*
Chemother, 19:593-597, 1981.
15. Willam, H.A.K.; Crowder, J.G.;
White, A.C. & Edmonds, J.N. -
Pericarditis due to *Vibrio fetus*.
Amer. J. Cardiol., 17:723-728,
1966.
16. Kilo, C.; Hageman, P.O. & Marzi, J.
- Septic arthritis and bacteremia
due to *Vibrio fetus*. *Amer. J. Med.*,
38:962-971, 1965.
17. Kist, M.; Keller, K.M.; Nielbling,
W. & Kilching, H. - *Campylobacter*
coli septicaemia associated with
septic abortion. *Infection*,
12:88-90, 1984.
18. Lander, K.P. & Gill, K.P.W. -
Campylobacter mastitis. *Vet. Rec.*,
105:333, 1979.
19. Lariviere, L.A.; Gaudreau, C.L. &
Turgeon, F.F. - Susceptibility of
clinical isolated of *Campylobacter*
jejuni to twenty five antimicrobial
agents. *J. Antimicrobial Chemoth.*,
18:681-685, 1986.
20. Levy, A.J. - A gastro-enteritis
outbreak probably due to a bovine
strain of *Vibrio*. *Yale J. Biol.*
Med., 18:243-248, 1946.
21. Medeiros, A.A.; O'Brien, T.F.;
Blaser, M. - Blatypes and
antibiotypes of sporadic and
outbreak-related isolates of
Campylobacter *jejuni*. In:
Interscience Conference on
Antimicrobial agents and
Chemotherapy, 23, Las Vegas, 1983.
Abstracts... p.775.
22. Nodolo, J.R.; Bisping, W. & Kirpal,
G. - Isolamento de *Campylobacter* sp
de bezerros com e sem diarréia.
Pesq. Vet. Bras., 7:23-25, 1987.
23. Modolo, J.R.; Bisping, W. & Kirpal,
G. - Características bioquímicas de
- Campylobacter* isolados de bezerros
com e sem diarréia. *Rev. Microbiol.*,
19:1-5, 1988.
24. Norby, R.; Mc Closkey, R.V.;
Zackrisson, G. & Falsen, E. -
Meningitis caused by *Campylobacter*
fetus esp. *jejuni*. *Brit. Med. J.*,
May:1164, 1980.
25. Primavesi, O.H. - Untersuchungen zur
Antibiotikaempfindlichkeit von
Campylobacter *jejuni*. *Hyg. Med.*,
8:138-140, 1980.
26. Rubsam, S.; Danner, K. & Weiss, R.
- Zur atiologischen fur akute
Enteritiden des Hundes. *Zbl. Vet.*
Med. B., 29:521-531, 1982.
27. Weber, A.; Lemke, C. & Schafer, R.
- Zur antibiotikaempfindlichkeit von
Campylobacter *jejuni* *Campylobacter*
coli, isoliert aus kotproben von
Schlachtschweinen. *Der. prakt.*
Tierarzt., 11:995-998, 1984.
28. Wright, E.P.; Tillett, H.E.; Hague,
J.T.; Clegg, F.G.; Darnell, R.;
Culshaw, J.A. & Sorrel, J.A. -
Milk-borne *Campylobacter enteritis*
in a rural area. *Hyg. Camb.*,
91:227-233, 1983.

Recebido para publicação em 17/05/88

ATIVIDADE DE TRÊS UREIDOPENICILINAS SOBRE BACILOS GRAM NEGATIVOS ISOLADOS NO RECIFE

M.N. Caetano-Pisciottano
A.J. Alves

Deptº de Farmácia
Laboratório de Microbiologia e Química
Terapêutica
Av. Prof. Arthur Sá, s/n Cidade
Universitária
50740 Recife PE, Brasil

M. Simeon de Buochberg
M. Attisso
M. Zuccarelli
& G. Dusart

Laboratório de Microbiologia
Faculdade de Farmácia
34040 Montpellier CEDEX França

Resumo

O estudo comparativo da atividade da azlocilina, da mezlocilina e da piperacilina sobre 123 cepas de bactérias Gram-negativas isoladas nos hospitais do Recife foi efetuado mediante a determinação das CIM e das CBM pela microtécnica de diluição em caldo. Estas três ureidopenicilinas apresentaram uma boa atividade contra *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* indol positivo e *Klebsiella*. Todas as cepas de *Pseudomonas* foram sensíveis à Azlocilina e à Piperacilina.

Introdução

As acilureidopenicilinas pertencem à família das betalactaminas do grupo das penicilinas. São derivados penânicos substituídos, isto é, possuem um núcleo beta-lactâmico e tiazolidínico, onde um grupo acil foi introduzido no grupamento amina da ampicilina (Figura 1).

A substituição no grupo amina permitiu à obtenção de derivados tais como: azlocilina, mezlocilina e a piperacilina que diferem entre si pela natureza do grupo R (Figura 2).

Os compostos utilizados no estudo são os seguintes: 1- Azlocilina (AZL): α - (2-oxo-1-imidazolinilcarboxamida) benzilpenicilina; 2 - Mezlocilina (MZ): α (3-metilsulfonil-2-oxo-1-imidazolinacarboxamida) benzilpenicilina. 3-Piperacilina (PIP): α -(4-etil-2,3-

dioxopiperazinacarboxamida)
benzilpenicilina.

Os fármacos em questão são novas penicilinas semi-sintéticas para serem administradas por via parenteral, pois apresentam, como a ampicilina, uma boa difusão tissular, especialmente no L.C.R.. São eliminadas por via renal e biliar. Apresentam um largo espectro de atividade, englobando bactérias Gram positivas: estafilococos, estreptococos, incluindo os enterococos, *Listeria* e *Clostridium*; os bacilos Gram negativos aeróbios e anaeróbios, com uma elevada atividade sobre *Pseudomonas*, germe geralmente pouco sensível para a maioria das outras betalactaminas. São antibióticos que agem inibindo a síntese do peptídeo glicano da parede celular. Suas atividades estão relacionadas aos seus bons coeficientes de penetração através dos poros da membrana externa dos

Figura 1 - Fórmula geral das acilureidopenicilinas.

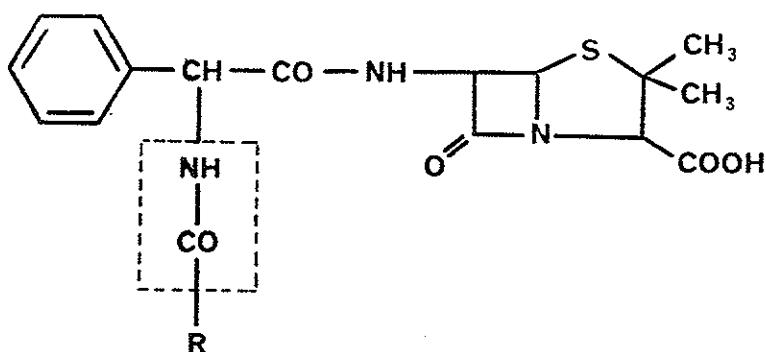
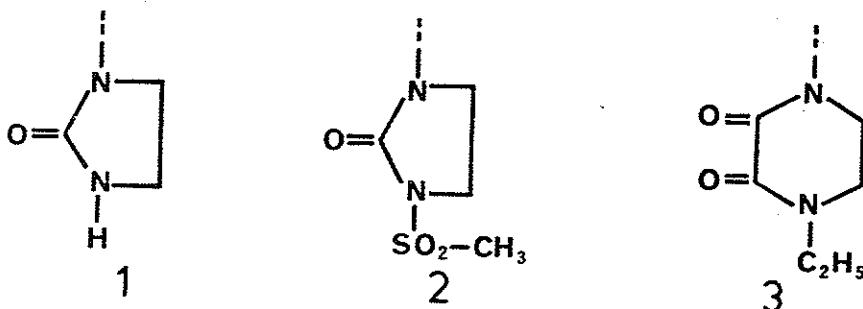


Figura 2 - Natureza do grupo R.



bacilos Gram-negativos, apesar do tamanho do grupo acilureído, e devido também as suas grandes afinidades pelas diversas proteínas da membrana, em particular a proteína PBP₃ (14).

As ureíopenicilinas são sensíveis às betalactamas mediadas por plasmídeos, no entanto são relativamente resistentes às betalactamas mediadas por cromossomos.

Em virtude desses três antibióticos ainda não serem comercializados no Brasil, consideramos importante realizar a comparação *in vitro* da atividade da azlocilina, da mezlocilina e da piperacilina pela determinação das CIM e das CBM em bacilos Gram negativos, principalmente em algumas espécies de enterobactérias e do bacilo piociânico, isolados nos hospitais do Recife.

Material e Métodos

Cepas bacterianas - Esse estudo foi realizado com 123 cepas isoladas de

urina e de fezes oriundas de alguns pacientes hospitalizados em Recife. As cepas estão relacionadas na Tabela 1 e foram identificadas pelo micrometodo API e conservadas em meio de glicerina no freezer (-20°C).

Antibióticos - A azlocilina e a mezlocilina foram fornecidas pelo laboratório BAYER-FRANÇA e a piperacilina pelo laboratório LEDERLE-FRANÇA.

Determinação das CIM e das CBM - As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram determinadas pela microtécnica de diluição em meio líquido, empregando o caldo Mueller-Hinton (5).

As diluições de cada antibiótico foram preparadas em escala de valores compreendendo de 128 à 0,03ug.ml⁻¹, e foram distribuídas nas microplacas. O inóculo bacteriano foi obtido partindo de culturas de 6 horas, em meio de Mueller-Hinton e diluídas de forma a obter 10⁵UFC para cada cavidade da placa contendo 100μl de meio. Após 18 horas de incubação, determinou-se a

Figura 3 - Porcentagens acumuladas das cepas de *Escherichia coli* inibidas respectivamente pela azlocilina, mezlocilina e a piperacilina. Estudo em 50 cepas.

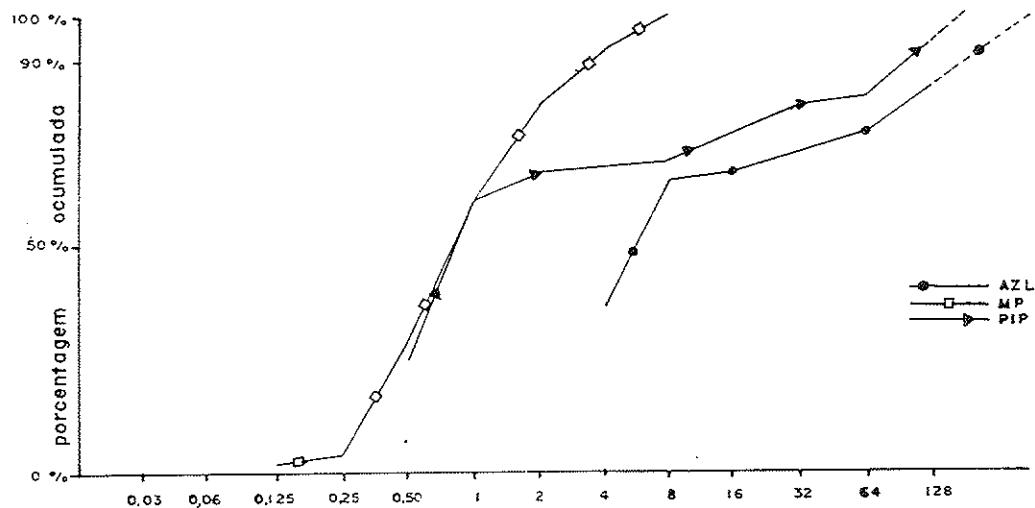
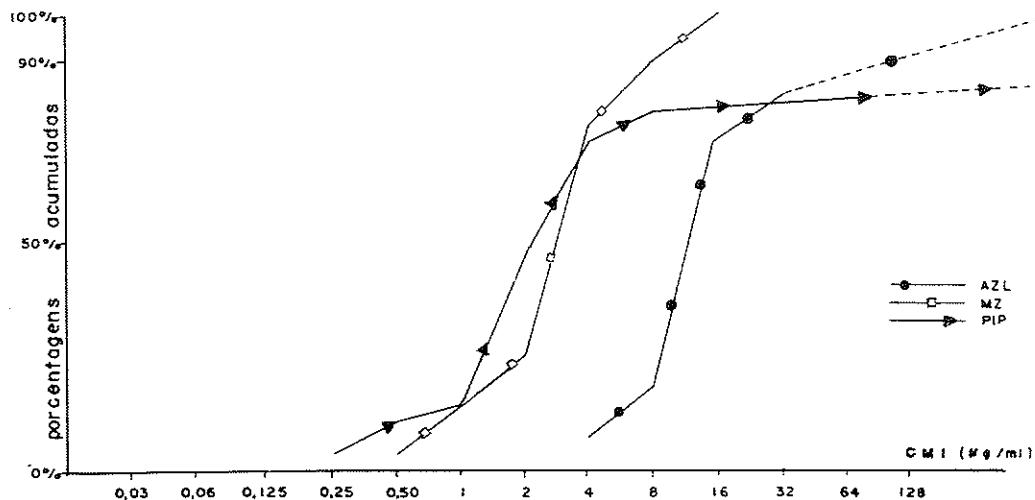


Figura 4 - Porcentagem acumuladas das cepas do grupo K.E.S. inibidas respectivamente pela azlocilina, mezlocilina e piperacilina. Estudo em 28 cepas.



CIM, que correspondeu a mais baixa concentração que não apresentou crescimento aparente. As CBM são determinadas pela comparação do número de bactérias sobreviventes em relação ao número de bactérias dos inóculos testemunhos.

Resultados

Na Tabela 2 encontram-se as atividades sobre as seguintes bactérias *E. coli*, *Klebsiella-Enterobacter-Serratia* (K-E-S), *Proteus-Providencia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Salmonella* e *Pseudomonas*, expressas em CIM extremas, CIM 50% e CIM 90%, como também as CBM extremas, CBM 50%, CBM 90% e as porcentagens de cepas resistentes.

As curvas de sensibilidade (Figuras 3 e 4) mostram a atividade bacteriostática comparada dos três antibióticos.

A interpretação dos resultados será efetuada considerando as seguintes concentrações críticas das três ureidopenicilinas (1): Azlocilina 16 - 128 $\mu\text{g.ml}^{-1}$; Mezlocilina 8 - 32 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e Piperacilina 16 - 128 $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

A análise dos resultados em conjunto demonstra, uma boa atividade dos três antibióticos contra *E. coli*, as espécies do grupo K-E-S e de *Proteus-Providencia*, apresentando porém algumas diferenças.

Com relação a *E. coli*, os valores extremos mais baixos são obtidos para a mezlocilina. As CIM modais foram de 1 $\mu\text{g.ml}^{-1}$, para a mezlocilina e piperacilina e de 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ para a azlocilina. Nenhuma cepa foi resistente à mezlocilina, enquanto que três apresentam resistência a piperacilina (6%) e oito a azlocilina (16%).

Nas espécies do grupo K-E-S, os valores mais baixos foram obtidos com a piperacilina cuja CIM modal foi de 2 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Os valores de CIM modal foram mais elevados para a mezlocilina (4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) e para a azlocilina (16 $\mu\text{g.ml}^{-1}$). Não se encontrou nenhuma cepa resistente à mezlocilina, enquanto que 17,9% mostraram-se resistentes aos outros dois antibióticos.

Com relação aos *Proteus*, os menores

valores observados relacionam-se a piperacilina (CIM modais de 0.125 - 0.25 - 0.50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$), enquanto que a CIM modal da mezlocilina foi de 0.50 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ e para a azlocilina de 1 a 4 $\mu\text{g.ml}^{-1}$. Nenhuma cepa apresentou resistência à piperacilina e à mezlocilina, e uma só, (4,3%), mostrou-se resistente à azlocilina.

Do ponto de vista geral, os melhores valores das CIM 90% foram obtidos nos seguintes casos: a mezlocilina (3.6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) contra a *E. coli*; a piperacilina (1.6 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) e a mezlocilina (2,9 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) sobre o grupo *Proteus-Providencia* e a mezlocilina (7.8 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) contra as espécies do grupo K-E-S.

Considerando-se as outras enterobactérias, os resultados devem ser interpretados de modo diferente, devido ao pequeno número de cepas isoladas para os gêneros *Shigella*, *Citrobacter* e *Salmonela*.

Uma única cepa de *Shigella flexneri* mostrou-se resistente à piperacilina tanto como à azlocilina. Todas as outras são sensíveis aos três antibióticos. Todas as cepas de *Pseudomonas aeruginosa* foram sensíveis, com valores de CIM muito baixos, tanto para a piperacilina, quanto para a azlocilina; no entanto apresentaram uma menor sensibilidade com relação a mezlocilina.

Uma única cepa de *Plesiomonas shigelloides* estudada mostrou-se resistente à azlocilina.

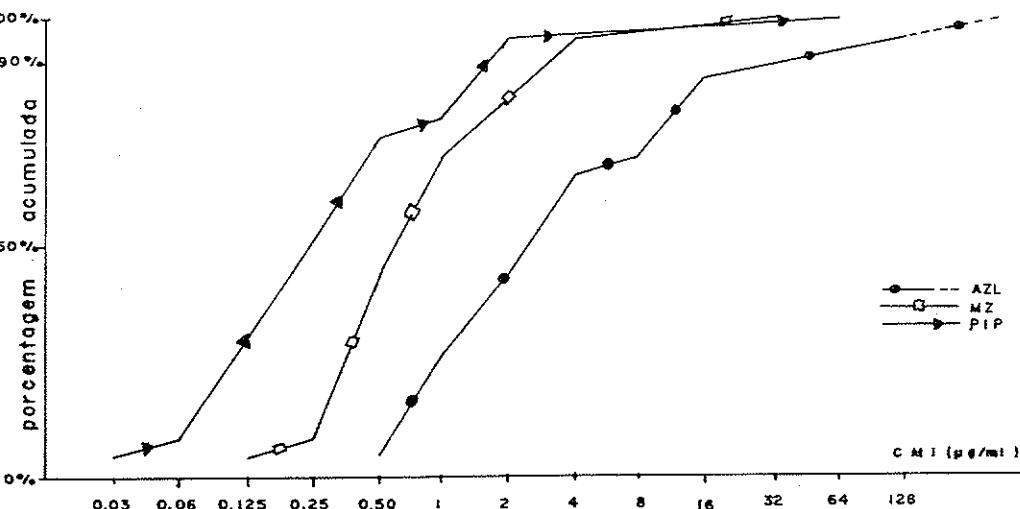
Discussão

Os resultados obtidos confirmam uma atividade muito boa das ureidopenicilinas sobre bactérias Gram-negativas. Essas conclusões são semelhantes às aquelas descritas por Soussy e col., apesar da origem diferente das cepas (13).

Este trabalho permite colocar em evidência a existência de cepas resistentes de *E. coli* e de *Klebsiella*.

Nas espécies produtoras de cefalosporinas: *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* indol positivos, observam-se duas populações de bactérias de sensibilidade diferente, uma com valores de CIM relativamente baixos, a outra com valores de CIM alcançando de 128

Figura 5 - Porcentagens acumuladas das cepas *Proteus providencia* respetivamente pela azlocilina, mezlocilina e piperacilina. Estudos em 23 cepas.



$\mu\text{g.ml}^{-1}$.

Sabe-se que as acilureidopenicilinas são inativadas pelas enzimas plasmídicas de largo espectro dos bacilos Gram-negativos tipo betalactamases TEM, OXA, PSE, SHV. No entanto, sabe-se que as enzimas cromossômicas geralmente produzidas em pequena quantidade não modificam sua atividade (6, 10, 12).

Finalmente observa-se uma excelente atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* dos três antibióticos qualificados de penicilinas antipseudomonásicas. Os níveis de atividades encontradas são semelhantes àqueles publicados por Massari (8), Modai (9) e por Reynaud (11), em particular os das CIM da azlocilina e da piperacilina, que são de quatro à oito vezes inferiores às da mezlocilina.

Os valores das CMB encontradas para os três antibióticos, são geralmente de duas a quatro vezes superiores aos valores das correspondentes CIM. Esses resultados estão de acordo com aqueles citados por Courvalin e col. (5).

As infecções, em particular as provocadas por *Pseudomonas*, (nas meningites, afecções das vias respiratórias, infecções osteo-articulares, abdominais ou biliares) constituem-se em indicações

terapêuticas de escolha para esses três antibióticos (2, 3, 4, 7).

Summary

Activity of three ureidepenicillins on Gram negative bacillus isolated in Recife

The comparative study of azlocillin, mezlocillin and piperacillin activity on 123 hospital strains of Gram negative bacteria isolated in Recife, have been possible by determination of MIC and MBC by a micro method. These three ureidepenicillins presented a good activity against *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella* and *Proteus* positive indol, and a reasonable activity against *Klebsiella*. All *Pseudomonas* strains are sensible to Azlocillin and Piperacillin.

Agradecimentos

Agradecemos ao LACEM, ao Dr. Gilson Cidrim, bacteriologista do LIAC, ao Dr. José Leôncio C. Neto, diretor do LEAC, ao Sr. Manoel Gomes de Andrade, pelo fornecimento das cepas bacterianas empregadas neste estudo.

Referências Bibliográficas

1. Acar, J.; Bergogne-Berezin, E.; Chabbert, Y.; Cluzel, R.; Courteain, A.; Courvalin, P.; Dabernat, H.; Drugeon, H.; Duval, J.; Fleurette, J.; Morel, C.; Philippon, A.; Sirot, J.; Soussy, C.J.; Trabaut, A. & Veron, M. - Communiqué du Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Path. Biol., 34:313-314, 1986.
2. Arnaud, A.; Gevaudan, M.J.; Saadjian, M.; Dugue, P. & Charpin, J. - Utilisation de l'Azlocilline dans le traitement des infections broncho-pulmonaires à *Pseudomonas*. Nouv. Presse Med., 13:834-837, 1984.
3. Canton, P.H.; May, T.H. - Infections ostéoarticulaires. Med. Mal. Inf., 16(11bis):700-706, 1986.
4. Cartier, F.; Michelet, C.; Dachary, M.; Thomas, R.; Bouget, J.; Camus, C. & Bousser, J. - Nouvelles bêta-lactamines dans le traitement des infections abdominales. Med. Mal. Inf., 16(11bis):725-733, 1986.
5. Courvalin, P.; Goldstein, F.; Philippon, A.; Sirot, J. - L'Antibiogramme. Paris, M.P.C. Videom, 1985.
6. Curtis, N.A.C.; Eisenstadt, R.L.; Rudd, C. & White, A.J. - Inductible type I β -lactamases of Gram-negative bacteria and resistance to β -lactam antibiotics. J. Antimicrob. Chemother., 17:51-61, 1986.
7. Grenier, B. - L'utilisation des nouvelles bêta-lactamines en pédiatrie. Med. Mal. Inf., 16(11):721-724, 1986.
8. Massari, P. - Les ureidopenicillines. Lettre Infect. 11(18):566-8, 1987.
9. Modai, J. & Thabaut, A. - Acyluréido - penicillines. Sem. Hôp. Paris, 32:2331-2338, 1985.
10. Philippon, A. & Paul, G. - β -lactamases: identification rôle, aspects épidémiologiques. Med. Mal. Inf., 16(11bis):644-654, 1986.
11. Reynaud, A.E.; Coude du Foresto, B.; Espaze, E.P. & Courtieu, A.L. - Sensibilité aux β -lactamines de *Pseudomonas aeruginosa*. Path. Biol., 35(7):1023-1026, 1987.
12. Sanders, C.C. & Sanders, F.W. - Emergence of resistance during therapy with the newer β -lactam antibiotics: rôle of inductible β -lactamases and implications for the future. Rev. Infect. Dis., 5:639-648, 1983.
13. Soussy, C.J.; Sirot, J.; Chanal, M.; Le Van Thoi, J.; Sirot, D.; Duval, J. & Cluzel, R. - Activité antibactérienne in vitro des nouvelles β -lactamines: uréidopenicillines, céphalosporines de 3 ème génération, monobactames, imipenem. Med. Mal. Inf., 16(11bis):666-673, 1986.
14. Spratt, B. - Penicillin - binding proteins and the future of β -lactam antibiotics. J. Gen. Microbiol., 129:1247-1260, 1983.

Recebido para publicação em 17/01/89

AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA DE DOIS DESINFETANTES HOSPITALARES

Ione Corrêa

Universidade Estadual de Campinas
Hospital das Clínicas
Cidade Universitária Zeferino Vaz
Distrito de Barão de Geraldo
13081 Campinas SP, Brasil

& José Francisco Hofling

Deptº de Diagnóstico Oral
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Universidade Estadual de Campinas
13400 Piracicaba SP, Brasil

Resumo

Microrganismos obtidos nas amostragens da superfície do piso do setor de pediatria e uma cepa padrão de *Staphylococcus aureus* - 6538 ATCC foram utilizados, com o propósito de se avaliar a atividade antimicrobiana de dois desinfetantes hospitalares "in vitro" e "in vivo". A amostragem da superfície - sem o procedimento de desinfecção - mostrou um aumento do número de colônias microbianas durante o período de atividade hospitalar. Este aumento foi em média de 53 colônias microbianas no período de 24 horas de amostragem. As amostragens realizadas após a aplicação dos desinfetantes - fenólio e amôneo quartenário - mostraram uma redução significativa no número de colônias microbianas obtidas somente durante 2 e 4 horas de aplicação, respectivamente. Os desinfetantes testados, se comportaram diferentemente quando comparados. Os resultados obtidos "in vitro", quando fatores de difusibilidade, toxicidade e matéria orgânica foram analisados, demonstraram diferenças significativas para ambos os desinfetantes quando comparados. Os resultados obtidos nos testes efetuados "in vivo", mostraram que na avaliação de desinfetantes hospitalares de superfície, deve-se levar em conta os diversos fatores que ocorrem "in situ", já que resultados obtidos de avaliação de laboratório - "in vitro" - podem não ser comparativos e, portanto, generalizados. As investigações - de modo geral - sugerem que a avaliação de desinfetantes hospitalares deve ser realizada através de dois ou mais testes levando-se em consideração os fenômenos que possam interferir - na ação antimicrobiana, tentando assemelhar o mais possível as condições nas quais estes produtos são utilizados.

Introdução

Nos últimos tempos, a atenção dos pesquisadores e profissionais da área de saúde tem sido direcionada à medicina preventiva que, na realidade, demanda menos tempo de trabalho, é menos onerosa e, principalmente, proporciona maior benefício à

população. Segundo Meirelles & Col. (14), a preocupação com este assunto é evidente quando se acredita que ao enfermeiro cabe grande parte da responsabilidade sobre o conhecimento e utilização dos germicidas, não só porque deve zelar pela segurança do cliente e da equipe de saúde, como também saber que a utilização racional

dos mesmos tem influência na redução dos custos diretos e intangíveis da infecção hospitalar. Os produtos comerciais utilizados na desinfecção das superfícies duras do ambiente hospitalar têm sido efetuados sob diferentes aspectos, no que diz respeito às suas propriedades físicas, químicas, toxicológicas e antimicrobianas.

O ambiente hospitalar apresenta flora microbiana complexa, tanto sob o ponto de vista qualitativo como quantitativo e essa complexidade fica perfeitamente caracterizada pelo elevado número de microrganismos detectados nas superfícies duras, compreendendo os mais diversos tipos morfológicos de microrganismos, Hall & Col. (10); Mizumo & Col. (15). Ailyffe & Col. (1), relataram que os patógenos comumente presentes no solo incluem *Staphylococcus aureus* e Bacilos gram negativos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa*. No entanto, Pelczar (16) e Pereira (17) afirmam que o tipo de contaminação varia muito com a população, atividade e a característica do hospital.

A mensuração da quantidade da contaminação bacteriana sobre superfícies em hospitais como assoalho, paredes, mesas e pias tem sido difícil, já que a prática de limpeza está baseada na aparência e tradição, esquecendo que a flora bacteriana do piso pode tornar-se corpos aéreos; as roupas de cama podem, ocasionalmente, tocar no piso, ou mesmo o paciente entrar em contato direto com o piso através dos pés contaminando a roupa de cama, conforme citado por Hall & Col. (10), Mizumo & Col. (15).

A Comissão de Controle de Infecção Hospitalar, (CCH) apoiada nos preceitos de assepsia e reconhecimento do potencial patogênico dos microrganismos do ambiente hospitalar, recomenda avaliação e controle dos agentes antimicrobianos, principalmente nas áreas críticas, visto que os antissépticos e desinfetantes são escolhidos em função do preço e de avaliações bacteriológicas inadequadas, ou de preferências individuais subjetivas, pois as empresas não declaram a composição quantitativa de seus produtos Zanon (22). Zanon & Col. (24)

relataram que a negligência em relação à escolha de germicidas envolve sérios riscos pela possibilidade do emprego do produto com atividade não satisfatória ou mesmo nula, e ainda, devido ao risco de contaminação bacteriana e consequente transformação dos mesmos em veículos de infecção no hospital.

Considerando-se que ainda existem muitos pontos a serem esclarecidos em relação à escolha e ação antimicrobiana de desinfetantes hospitalares procurou-se: a) Determinar quantitativa e qualitativamente os microrganismos existentes na superfície do piso do setor de Pediatria, com e sem a aplicação dos desinfetantes fenólico e amônio quaternário; b) Avaliar "in vitro" a ação antimicrobiana desses desinfetantes sobre os microrganismos obtidos nas amostragens, particularmente aqueles associados à infecção hospitalar em comparação com amostras de uma cepa padronizada de *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC.

Material e Métodos

Material

Desinfetantes - Os produtos comerciais analisados foram dois desinfetantes, comumente utilizados na desinfecção de superfícies duras do ambiente hospitalar: Duplofen (fenólico) e Duocid (amônio quaternário).

Microrganismo padrão - Na comprovação da ação antimicrobiana "in vitro" de ambos os desinfetantes, utilizou-se uma amostra de *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC, proveniente do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, padronizadas para análise de desinfetantes, segundo Brummer (4).

Amostragem da superfície - A metodologia empregada nas amostragens da superfície do piso, baseou-se naquela descrita por Hall & Col. (10), utilizando-se placas de Petri tipo "Rodac plate (Falcon)", com meio de cultura Lethen agar, para neutralizar ação residual de desinfetantes, Vesley & Col. (21); Brummer (4). Placas contendo 16ml do meio de cultura Lethen agar, foram usadas para a coleta de material de superfície, sob o berço, com ou sem criança,

pressionando-a levemente sobre o piso, nos horários previamente determinados para amostragens: antes da desinfecção e após 0, 2, 4, 8, 16 e 24 horas da aplicação dos desinfetantes testados.

A coleta de material da superfície estendeu-se pelo período de 12 meses, durante os quais às segunda-feiras foram realizadas as amostragens em 5 locais pré-determinados.

Nos 4 primeiros meses (janeiro-abril) a amostragem foi realizada sem o procedimento de limpeza. Nos quatro meses seguintes (maio-agosto), repetiu-se o procedimento após a desinfecção com o desinfetante fenólico e nos quatro meses subsequentes (setembro-dezembro) a desinfecção foi realizada com o desinfetante amônico quaternário. Após a coleta das amostras, todas as placas foram incubadas à 37°C durante 24 horas e posteriormente, fez-se contagens das colônias, através de um contador mecânico (Phoenix MOD EC 550). A observação dos aspectos das colônias sobre a superfície do agar, propriedades tintoriais, hemólise em agar sangue, prova da catalase e prova da coagulase, foram realizadas com o objetivo de identificar os microrganismos patogênicos associados à infecção hospitalar.

Métodos

Testes de sensibilidade dos desinfetantes

Difusão em gel de agar - Os diferentes microrganismos *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC e *Staphylococcus aureus* (coagulase positivo) foram cultivados em "Triplicase Soy Broth", previamente distribuídos em tubo de ensaio. Decorrido o período de incubação adequado, as suspensões bacterianas foram homogeneizadas através de um agitador de tubos (Marca Phoenix Mod At 56), durante um minuto. Posteriormente, a turvação do crescimento bacteriano foi comparada com a turbidez padrão da solução de sulfato de bário, tubo nº 3 da escala de "Mc Farland" Bier (3), que corresponde, aproximadamente a 9×10^8 cels/ml. Após ajustada a turbidez da suspensão bacteriana com a turbidez padrão, o material foi semeado na superfície do meio de cultura "Muller

Hilton" com auxílio de "Swab", de modo a se obter um crescimento confluente. Deixou-se as placas durante 30 minutos a temperatura ambiente e colocou-se os discos de papel de filtro, (papel Whatman nº 1) com dimensões semelhantes aquelas utilizadas nos testes de antibiograma, contendo 0,1ml de solução desinfetante na diluição recomendada para uso de acordo com a recomendação do fabricante (3%). Como controle, colocou-se discos contendo 0,1ml de solução salina. Após permanecer 20 minutos em repouso a temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas em seguida procedeu-se a leitura dos diâmetros dos halos, utilizando-se uma régua.

Paralelamente a cada experimento foram realizados dois controles: um para testar as condições bacteriológicas dos discos de papel de filtro e outro para verificar a viabilidade dos microrganismos testados.

Teste de diluição dos desinfetantes - O método de diluição é uma modificação do "Yanis dilution method", descrito por Litsky & Col. (13). Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC e *Staphylococcus aureus*, (coagulase positivo) foram repicadas em 5ml de TSB e incubadas durante 24 horas a 37°C, resultando cultivos com 10^6 cels/ml. Misturou-se 0,2ml de cultivo de cada cepa a 1ml de soro humano (utilizado como matéria orgânica) sendo a mistura adicionada a 4ml de cada desinfetante. Após agitação manual durante 1 minuto os tubos foram deixados à temperatura ambiente durante 5, 10, 15 e 30 minutos, 2, 4, 8, 16 e 24 horas, e novamente agitados durante 1 minuto. Uma alíquota de 1ml dessa mistura foi semeada em placas de "Letcheen agar" e posteriormente incubadas durante 24 horas à 37°C. Após a incubação foram feitas contagens das colônias através de um contador mecânico (Phoenix Mod EC 550 A). Como controle realizou-se testes na ausência de matéria orgânica e com solução salina a 0,85%. Cada prova foi realizada em triplicata.

Resultados e Discussão

O procedimento de desinfecção, apesar de se constituir na remoção parcial de

microrganismos da superfície a ser desinfetada, não deixa de ser um recurso importante na remoção destes contaminantes, diminuindo, assim, a sua proliferação no ambiente e, consequentemente, o risco de infecção hospitalar. Segundo Zanon & Col. (23), a negligência em relação à escolha de germicidas envolve sérios riscos pela possibilidade do emprego do produto com atividade não satisfatória - ou mesmo nula - e ainda, devido o risco de contaminação bacteriana e consequente, transformação dos mesmos em veículo de infecção hospitalar.

A primeira fase desta investigação foi direcionada na simulação das condições mais semelhantes às encontradas no procedimento de rotina hospitalar, realizando-se amostragens através de placas de superfície tipo "Rodac plate" no período ambiente hospitalar. Os resultados dessas coletas, com e sem a aplicação dos desinfetantes fenólico e amôneo quaternário - analisadas através das médias totais de colônias visíveis - sobre o meio de cultura "Lethen agar" a 37°C durante 24 horas de incubação, mostraram diferenças em relação ao número de colônias microbianas, segundo o horário de amostragens, quando comparados. Assim, os resultados obtidos das coletas da superfície do piso para quantificar a flora microbiana sem o procedimento de desinfecção, mostrou que ocorre aumento do número de colônias microbianas durante todo decorrer da atividade hospitalar (Gráfico I). Esse aumento foi em média de 53 colônias microbianas no período de 24 horas de amostragens. Estes dados confirmam as observações feitas por Vesley & Col. (21) quanto ao aumento do número de colônias microbianas no decorrer da atividade hospitalar, quando analisada sem a intervenção de produtos químicos, sendo que este aumento de colônias está relacionado com a reprodução e proliferação de microrganismos. Segundo Top (20) existe um constante trânsito de microrganismos entre o homem e o meio ambiente, consequentemente, todos esses microrganismos estão presentes por 24 horas de permanência, na roupa da cama, pisos, paredes, pias e até mesmo no ar do quarto. Tais fatos demonstraram a necessidade de se

utilizar meios adequados para interromper a reprodução e, consequentemente, a proliferação destes microrganismos, principalmente no ambiente hospitalar, já que Zanon & Col. (23) demonstraram que o hospital concentra e reúne intimamente os pacientes mais suscetíveis e os microrganismos mais resistentes.

Os resultados obtidos nas amostragens da superfície do piso, sem o procedimento de limpeza, mostraram, ainda que para todos os meses de coleta, o percentual de crescimento microbiano foi maior no período das 7 às 8 horas e das 12 às 16 horas em relação aos demais períodos. Tais dados mostram que o crescimento microbiano foi mais acentuado no período de maior atividade e, consequentemente, maior movimentação hospitalar.

Esses dados confirmam as observações feitas por Edmunds (5); Smylie & Col. (19); Hutzler (11); Pelczar (16) e Pereira (17), quando afirmam que a contaminação está diretamente relacionada com a movimentação, atividade e o tipo de população do ambiente analisado.

A análise dos resultados referentes ao efeito da aplicação dos desinfetantes fenólico e amôneo quaternário sobre a superfície do piso, empregados na diluição recomendada para uso, mostrou que houve redução de 41% e 55%, respectivamente, no número de colônias microbianas, imediatamente após o procedimento de desinfecção (Gráfico 2). Tais resultados, indicam que o procedimento de desinfecção provoca remoção parcial dos microrganismos existentes sobre a superfície do piso hospitalar. Esses resultados confirmam os citados por Hall & Col. (10); Vesley & Col. (21); Favero (6); Litsky & Col. (13); Sanford (18) e Brummer (4), quanto à redução dos microrganismos verificada imediatamente após o procedimento de desinfecção, o que mostra, claramente, a necessidade do uso de produtos antimicrobianos no ambiente hospitalar, valorizando, assim, o programa de saneamento ambiental.

Nas investigações essa redução do número de colônias microbianas manifestou-se até 2 horas após a aplicação do desinfetante fenólico e até 4 horas para o desinfetante amôneo quaternário. Segundo Gable (8), o uso

Gráfico 1 - Médias totais do número de colônias microbianas da superfície do piso, sem o procedimento de limpeza durante o período de 24 horas.

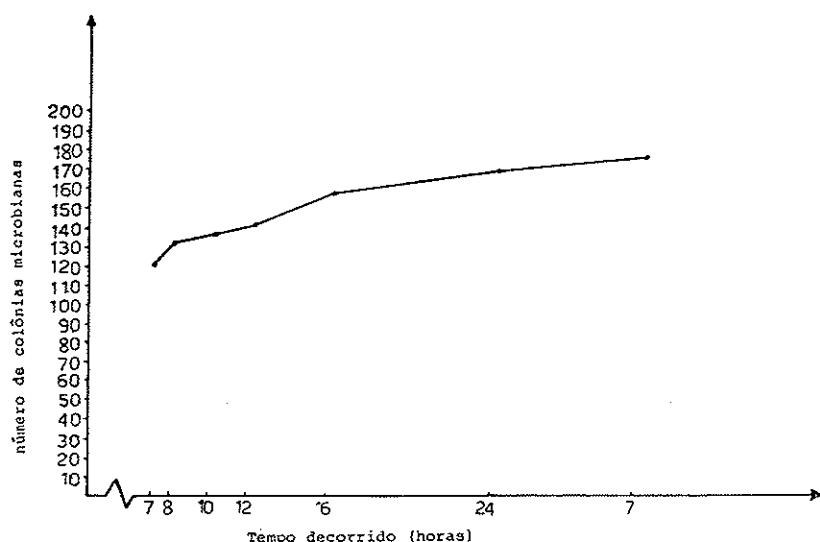
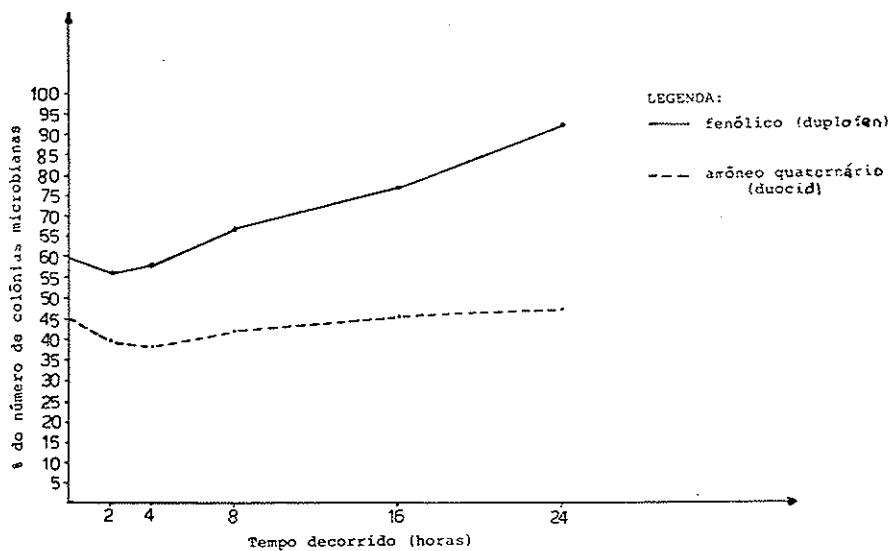


Gráfico 2 - Percentual do número de colônias microbianas superfície do piso, após a desinfecção com o desinfetante quaternário e fenólico.



de produtos químicos na desinfecção da superfície, realmente provoca uma redução parcial do número de microrganismos existentes sobre a superfície do piso. Essa redução está diretamente relacionada com o tipo de desinfetante usado e o tipo de superfície analisada. Os resultados obtidos nas amostragens da superfície do piso com os desinfetantes testados demonstraram que ambos possuem período de ação residual muito pequeno quando associados à rotina de limpeza hospitalar, o que sugere intervalos de desinfecção mais curtos, quando tais produtos são utilizados, embora, para a amostragem, considerou-se apenas o tipo de desinfetante testado, pois a coleta foi padronizada em apenas um tipo hospitalar.

Os testes realizado para a observação dos microrganismos, antes da aplicação dos desinfetantes testados, mostraram a presença de bacilos esporulados, fungos, bactérias do gênero *Staphylococcus aureus* positivo e *Staphylococcus coagulase* negativo. Após o uso de ambos os desinfetante, houve redução do número de colônias microbianas, exceto o *Staphylococcus aureus* coagulase positivo onde não se constatou nenhuma redução no número de colônias (Tabela 1). Zanon & Col. (23), ao reverem a literatura médica mundial, colocam o *Staphylococcus aureus* como o principal responsável por infecções hospitalares até a década de sessenta, sendo que nos últimos sete anos, a sua incidência vem decaindo, concomitantemente com um aumento de bastonetes gram negativos. Na presente pesquisa o único microrganismo causador de infecção hospitalar, encontrado nas amostragens realizadas após a aplicação de ambos desinfetantes, foi o *Staphylococcus coagulase* positivo, não sendo observado, portanto, bastonetes gram negativos como *Pseudomonas* nas coletas. No entanto, Pelczar (16) e Pereira (17), concluiram que existe uma variação da flora microbiana do ambiente hospitalar, afirmando que a mesma está relacionada com a especialidade, tipo de população, e a característica do hospital.

Os resultados "in vitro" na comprovação do poder bactericida do desinfetante fenólico (Duplofen) e

Tabela 1 - Tipos de microrganismos isolados da superfície do piso antes e após a desinfecção de rotina com os desinfetantes fenólico (duplofen) e amôneo quaternário (duocid).

Simbolos: - = nenhuma colônia microbiana; + = menos que 10 colônias microbianas; ++ = 10 - 20 colônias microbianas ; +++ = 20 - 30 colônias microbianas; +++++ = 30 - 40 colônias microbianas; ++++++ = 40 - 50 colônias microbianas; +++++++ = mais que 50 colônias microbianas.

Microrganismo	Solução desinfetante			
	Duocid	Duplofen	antes	depois
<i>Staphylococcus coagulase</i> +	*	*	*	*
<i>Staphylococcus coagulase</i> -	++	-	++	-
Bacilos esporulados	+++++	+	++++	+
Fungos	++++++	+	+++++	+

amôneo quaternário (Duocid) através do teste de difusão em agar e do teste de "dilution use", mostraram diferenças em relação a sua ação antimicrobiana. A análise dos desinfetantes, através da difusão em meio sólido (agar Muller Hinton) quando comparados, demonstraram diferenças mínimas com relação aos halos de inibição obtidos ou seja: 18 (Duocid); 13 (Fenol); 0 (Salina) e 18 (Duocid); 12 (Fenol); 0 (Salina), respectivamente, *S. aureus* 6538 ATCC e *S. aureus* coagulase positivo. Segundo Kim (12), nesse modelo de estudo, o efeito antimicrobiano expresso através do diâmetro do halo de inibição, é dependente da toxicidade da substância ao microrganismo testado, e da difusibilidade no meio de cultura teste, com relação a capacidade de sua estrutura química, do tamanho da molécula e da velocidade de liberação da matriz insolúvel a que está ligado. Embora tais fatores estejam presentes, os resultados obtidos com ambos os desinfetantes testados, sugerem maior ação bactericida e/ou maior difusão com relação ao desinfetante amôneo quaternário (Duocid).

Os resultados obtidos no teste de "dilution use" em relação ao tempo de contato na presença e ausência de

Tabela 2 - Efeito de matéria orgânica na atividade dos desinfetantes amôneo quaternário e fenólico.

Símbolos: A - *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC; B - *Staphylococcus coagulase positivo*; O - sem matéria orgânica; E - com matéria orgânica.

Soluções Testadas	Período de contato com as soluções desinfetantes (minutos)																	
	5		10		15		30		120		240		480		960		1440	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	R	A	B	A	B	A	B	A	B
Amôniaco	D	O	C	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Quaternário	E	2	5	2	4	2	4	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fenol	D	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
Saliva (Controle)	E	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O
	416	418	416	418	400	405	390	405	390	400	400	400	400	400	420	420	451	

matéria orgânica (plasma humano) para o desinfetante fenólico, amôneo quaternário e solução salina, acham-se expressos na Tabela 2. Para o desinfetante fenólico, não se observou crescimento bacteriano em todos os tempos analisados, o que demonstra que a matéria orgânica não é um fator limitante para este composto. Segundo Pelczar & Col. (16), os compostos fenólicos atuam pela desnaturação das proteínas celulares e pelo dano das membranas celulares. Segundo Zanon & Col. (23), estes compostos fenólicos, quando associados a sabão, ou a detergentes aniónicos, aumentam substancialmente sua atividade antimicrobiana, devido à maior solubilidade e, consequentemente, maior penetração na célula bacteriana. Esse mesmo autor, concluiu, ainda, que estes compostos não são inativados pela matéria orgânica e não são voláteis. Assim, estes resultados confirmam as observações feitas por Zanon & Col. (23) em relação à matéria orgânica, sugerindo que estes produtos possuem um importante efeito na remoção de contaminantes, devendo ser recomendado no procedimento da desinfecção de superfície hospitalar.

Os resultados obtidos nos testes realizados com o desinfetante amôneo quaternário na presença de matéria orgânica, apresentam redução no número de colônias microbianas até os 30 minutos de contato. Com relação a tempos de contato mais prolongados, não se observou crescimento bacteriano. É possível que o desinfetante Duocid a 3% (amôneo quaternário), até os 30 minutos de

contato, possua um efeito bacteriostático.

Os resultados obtidos, nos testes levados a efeito na ausência da matéria orgânica, com o desinfetante Duocid, não mostraram crescimento de colônias bacterianas em todos os tempos analisados. Os trabalhos de Gelinas & Col. (9) indicam que a grande maioria dos desinfetantes hospitalares catiônicos apresentam inibição parcial ou total quando analisados na presença de matéria orgânica, o que nos permite sugerir que o desinfetante Duocid mostra inativação parcial na presença de matéria orgânica, necessitando de um tempo prolongado (30 minutos) para atingir o seu poder bactericida. Segundo Pelczar & Col. (16), o mecanismo de ação dos desinfetantes catiônicos ocorre através da inibição enzimática, pela desnaturação proteica e a lesão da membrana citoplasmática, com vazamento dos constituintes celulares, sendo que estes mecanismos podem estar associados ou não na atuação da inibição e morte das células microbianas. No entanto, Fellemburg (7), relata que, apesar de existir um esquema geral uniforme para a estrutura das membranas, a permeabilidade frente a diversas substâncias pode mostrar-se bastante diferente, às vezes específicas para cada órgão. A capacidade de absorção - capacidade de aceitação de substâncias externas - dos diferentes organismos varia. Entretanto, as substâncias maiores que os diâmetros dos poros penetram pelas células com grande dificuldade, sendo que este procedimento está relacionado com a temperatura e a concentração da substâncias nas vizinhanças da célula

envolvida. Entretanto, os mecanismos relacionados com a inibição total ou parcial dos desinfetantes, quando analizados na presença de matéria orgânica, parecem ainda necessitar de maiores investigações.

Os resultados obtidos nas investigações - de modo geral - tanto "in vitro", como "in vivo", sugerem que a avaliação de desinfetantes hospitalares, deve ser realizada através de dois ou mais testes, levando-se em consideração os fenômenos que possam interferir na ação antibacteriana - tentando assemelhar o mais possível às condições, nas quais estes produtos são utilizados - já que resultados discrepantes podem ser encontrados quando vários métodos são utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana desses desinfetantes. Segundo Zanon & Col. (23), há carência em nosso meio de dados sobre o problema sendo que as informação disponíveis referem-se, geralmente, à atividade do agente germicida isolado, sem levar em consideração os fenômenos de antagonismos ou de sinergismo, que possam ocorrer em presença dos vários componentes do produto.

Summary

Antimicrobial action evaluation of two Hospital disinfectants

Microrganisms collected from Pediatric floor sampling surface and *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 strain were used on the antimicrobial action evaluation of Hospital surface disinfectants. The sample of the surface without previous disinfection showed an increase of the number of microrganisms colonies during all the Hospital activity period. There was an average increase of 53 microbial colonies in a 24 hour-time samplings carried out after both phenolic and quaternary ammonium disinfectant applications showed a significant reduction on the microbial colonies only during 2 to 4 hours application, respectively. The two tested decontaminants showed a different action when both was compared. The results obtained "in vitro" when difusibility factors, toxicity and organic substance were analysed, showed significant

differences when both disinfectants were analysed. The "in vivo" results showed that on the evaluation of Hospital decontaminants, different factors occurring "in situ" must be included. Laboratorial tests carried out only "in vitro" do not seems to be enough to make comparisons and generalizations. It was clearly demonstrated by investigations that the evaluation purposes of the antibacterial agents must take in account that various factors might be involved on the antimicrobial action. So, two or more tests must be carried out assembling the real conditions in which such products are used.

Referências Bibliográficas

1. Ayliffe, G.A.J. & Collins, B.J. - Problems of disinfection in hospitals. In: Lawrende, C.A. & Block, S.S. - Principles and practice of disinfection and sterilization. London, Blackwell, 1982. p.224-59.
2. Beumer, J. - L'usage des desinfectants dans le regles de bonne pratique de fabrication. J. pharm. Bel., 36:375-9, 1981.
3. Bier, O. - Bacteriologia e Imunologia. 20. ed. São Paulo, Melhoramentos, 1980.
4. Brummer, B. - Influence of possible disinfectant transfer on *Staphylococcus aureus* plate counts after agar contact sampling. Appl. envir. Microbiol., 32(1):80-4, 1976.
5. Edmunds, P.N. - Staphylococcal infection in subdivided general surgical wards. J. hyp. Camb., 68:531-47, 1970.
6. Favero, M.S. et alii - Microbiological sampling of surfaces. J. appl. Bact., 31:336-46, 1968.
7. Fellemburg, G. - Introdução aos problemas da poluição ambiental. São Paulo, EPU; Springer, EDUSP, 1980. p.4-16.
8. Gable, T.S. Bacteriological effectiveness of floor cleaning methods in a hospital environment. Hospital, 40:107-11, 1966.
9. Gelinas, P.; Goulet, J. - Heat and light stability of sanitizers. J. Fd. Prot., 45:1195-6, 1982.
10. Hall, L.B.; Harnett, M.J. - Measurement of the bacterial

- contamination on surfaces in Hospitals. *Publ. Hlth Rep.* Wash., 79:1021-4, 1964.
11. Hutzler, R.U. - Fatores predisponentes de infecção hospitalar. *Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. S. Paulo*, 28:147-52, 1973.
12. Kim, H.Y. - Experimental study on the antibacterial effects of root canal filling materials. *J. Korean dent. Ass.*, 10(1):35-40, 1972.
13. Listsky, B.Y.; Litsky, W. - investigations on decontamination of hospital surfaces by use of disinfectant detergents. *J. Am. Publ. Hlth Ass.*, 58:534-43, 1968.
14. Meirelles Neto, J.R.; Gontijo Filho, P.P. - Atividade tuberculicida de alguns detergentes catiônicos. *Folha med.*, 87(4):227-32, 1983.
15. Mizumo, I.G.; Pryor, A.K. - Evaluation detergent-germicidas for hospital use. *Hospitals*, 40(2):88-100, 1966.
16. Pelczar, M.; Reid, R.; Chan, E.C.S. - Microbiologia do ar. In: Pelczar, M.; Reid.; Chan, E.C.S. *Microbiologia*. São Paulo, Mc Graw-Hill do Brasil, 1980. v.2. cap. 35. p.859-71.
17. Pereira, A.A. - Infecção hospitalar: integração clínico Laboratorial. *Hosp. Med.*, 1:32-40, 1984.
18. Sanford, J.P. - Disinfectants that don't. *Ann. intern. Med.*, 72(2):282-3, 1970.
19. Smyle, H.G. et alii - Ward desing in relation to postoperative wound infection. Part I., *Br. med. J.*, 1:67-72, 1971.
20. Top, F.H. - The hospital environment. A crossroads for infection. *Archs envir. Heth.*, 21:678-88, 1970.
21. Vesley, D.; Michaelsen, G.S. - Application of a surface sampling technic to the evaluation of bacteriological effectiveness of bertanin hospital housekeeping procedures. *Hlth Lab. Sci.*, 1(2):107-12, 1964.
22. Zanon, U. - Desinfetantes, antissépticos e infecção hospitalar O semestre Terap., 29(2):48-64, 1973a.
23. Zanon, U.; Nogueira de Madeiros, J. - Avaliação da atividade pseudomonicida dos desinfetantes hospitalares. *Rev. Paul. Hosp.*, 5:211-17, 1973.
24. Zanon, U. et alii - Controle de infecções hospitalares. *Rev. Paul. Hosp.*, 23(8):351-60, 1975.

Recebido para publicação em 2/02/89

ESTUDO EM CAMUNDONGOS (CBA X C57B1/10) F₁ DA INFLUÊNCIA DA ENTEROTOXINA TERMOESTÁVEL (STA) DE *ESCHERICHIA COLI* NA FAGOCITOSE

Maria Rita Labegalini Zucato
 Antonio F. Pestana de Castro
 Lucila Costallat Ricci
 & Marcos Garcia Costa

Deptº de Microbiologia e Imunologia
 I.B.
 Universidade Estadual de Campinas
 Cidade Universitária
 13081 Campinas SP, Brasil

Resumo

Camundongos (CBA x C57B1/10) F₁ foram utilizados para se estudar a atividade fagocitária de seus macrófagos após a inoculação, nos animais, da enterotoxina termoestável (STA) de *Escherichia coli*, obtida a partir de um amostra de origem humana (sorogrupo 0128), semipurificada de acordo com Ricci e col (1982). Foi utilizada a técnica de Depuração de Carbono Coloidal em camundongos inoculados com 250 unidades tóxicas (UT) de STA, em diferentes intervalos de tempo. Os resultados mostraram que 250UT de STA aumentaram a velocidade de depuração do carbono coloidal quando inoculadas com a toxina 24, 48, 72 e 96 horas antes da administração da substância coloidal. Em inoculações feitas antes e após estes tempos não houve interferência significativa da toxina, sendo que a injeção de STA 48 horas antes do carbono coloidal, correspondia ao pico de depuração do mesmo.

Introdução

Basicamente as amostras de *E. coli* podem produzir dois tipos de enterotoxina, uma de baixo peso molecular, dialisável, detectável pelo teste de camundongo recém-nascido e termoestável (100°C 15 min.), denominada STA (8, 14, 10) e outra de alto peso molecular, não dialisável e termolábil, conhecida como LT (10, 37). A enterotoxina LT se acha, hoje, muito bem estudada quanto a sua natureza química, características antigênicas e efeitos biológicos. Corresponde a uma proteína de PM ao redor de 84000 a 91000 daltons com capacidade de ativar a adenil ciclase levando a um aumento do AMP-c (9, 16).

Com relação a enterotoxina STA, só recentemente se conseguiu a sua purificação (1, 8, 14, 36), bem como se determinou que a sua natureza química era peptídica com cerca de 18

a 19 aminoácidos, com peso molecular ao redor de 1500 daltons (1, 3, 7, 8). Atualmente é conhecido outro tipo de enterotoxina termoestável, denominada STb, ativa unicamente em alça ligada de leitões de 5 a 7 semanas (20, 42). Não se conhece os mecanismos pelos quais a enterotoxina STb é capaz de causar diarréia em suínos, porém, a enterotoxina STA é capaz de ativar a enzima guanil-ciclase, ocasionando um aumento de GMP-c intracelular (12, 15, 22).

Apesar da enterotoxina STA ser considerada pouco imunogênica, sendo capaz de induzir a formação de anticorpo anti-STA apenas quando inoculada acoplada à um antígeno completo (19), em trabalho anterior (42), observamos a capacidade desta enterotoxina causar alterações na resposta imune humoral à hemácia de carneiro, quando inoculada em camundongos, antes ou após este

Auxílio financeiro do CNPq, FAPESP e FINEP.

Rev. Microbiol., São Paulo, 20(4):411-418, Out./Dez. 1989

antígeno. Isto nos levou a pesquisar a ação desta toxina, em particular, sobre os macrófagos, já que estas células são fundamentais na resposta imune (11, 25, 26, 30).

Material e Métodos

Animais - Camundongos (CBA x C57B1/10)F1, com 2 meses de idade, de ambos os sexos, com 20 gramas de peso, foram utilizados em todos os experimentos; b) camundongos Swiss-55, recém-nascidos, de 2 a 4 dias de idade, foram usados na detecção da enterotoxina STa através do teste do camundongo recém-nascido (CRN) (8).

Amostra - Amostra de *E. coli* H3 (sorogrupo 0128), isolada de criança com diarréia, em Campinas, produtora única e exclusivamente da enterotoxina STa, foi usada para a produção da toxina (35). Foi definida como 1 unidade tóxica (1UT), a quantidade de enterotoxina semipurificada capaz de causar no teste do CRN uma relação peso dos intestinos/peso das carcaças igual ou maior a 0,085.

Preparo e semipurificação da enterotoxina STa - Para o preparo e semipurificação da enterotoxina STa foram utilizados os procedimentos descritos por Ricci e col. (1982).

Inativação da enterotoxina STa - Aliquotas da enterotoxina semipurificada, foram aquecidas em banho-maria a 100°C por 15 minutos e outras, autoclavadas a 121°C por 30 minutos. Após este tratamento, foram analisadas pelo teste do CRN (8) para avaliar a permanência ou não de atividade da STa.

Carbono coloidal - A preparação utilizada continha 64mg/ml de carbono coloidal com partículas de 250A° de tamanho, suspensas em gelatina de peixe a 1%.

Depuração do carbono coloidal - A depuração do carbono coloidal foi determinada através da técnica descrita por Biozzi e col. (1954). Camundongos (CBA x C57B1/10)F1 controles e os inoculados com a enterotoxina STa (250UT)

semipurificada, foram inoculados intravenosamente, com 0,2ml de carbono coloidal (8mg/100gr da massa corporal do animal) efetuando-se a sangria de 0,025ml, com pipeta calibrada e heparinizada, pelo plexo venoso ocular, nos seguintes intervalos de tempo: 2, 5, 10, 15 e 20 minutos após cada inoculação. Cada amostra de sangue retirada foi adicionada imediatamente a 2,0ml de água destilada a fim de provocar a lise das hemácias. Posteriormente, determinou-se os valores de absorbância a 640nm em espectrofotômetro Colleman Jr. Após as sangrias, os animais foram sacrificados, por deslocamento cervical, e os órgãos, fígado e baço, retirados e pesados. O índice de fagocitose corrigido, α , que expressam a velocidade de depuração do carbono coloidal, foram calculados conforme padronizado por Biozzi e col., 1954.

Resultados

Com a finalidade de se estudar a possibilidade da toxina STa intervir na função fagocitária dos macrófagos, foram feitos experimentos com camundongos, injetados com 250UT da mesma, 24, 48, 72, 96 e 120 horas antes da inoculação do carbono coloidal.

Os resultados obtidos, expressos na Figura 1, mostram que 250UT aumentam a velocidade de depuração do carbono coloidal quando administradas 24, 48, 72 e 96 horas antes da administração do mesmo e que antes ou após estes tempos, não houve interferência significativa da toxina e a inoculação 48 horas antes, correspondia ao pico de depuração do carbono coloidal.

Confirmindo estes dados, na análise comparativa dos valores de K e α , observamos que ambos se apresentaram significativamente aumentados, em comparação ao grupo controle, quando a enterotoxina STa foi aplicada 48 horas antes do carbono coloidal (Tabela 1). Em trabalho anterior (42) observamos supressão na resposta imune humoral à hemácia de carneiro, quando a enterotoxina foi inoculada neste tempo, sugerindo que provavelmente os produtos liberados pela ativação dos macrófagos sejam os responsáveis pelas alterações observadas (13, 18).

Para confirmação da real ação da STa,

Figura 1 - Índice de fagocitose (K) no teste de depuração do carbono coloidal em camundongos (CBA x C₅₇B1/10)F₁, inoculados com 250UT de enterotoxina termo-estável (STa) em diferentes tempos. Cada ponto representa a média aritmética \pm 1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 8 animais. Animais controles (---). Animais inoculados com a enterotoxina STa (—).

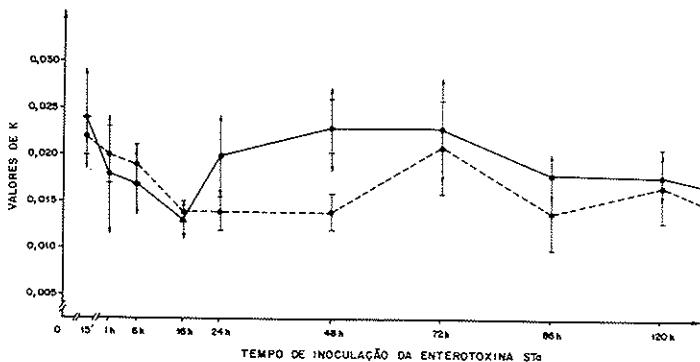


Tabela 1 - Efeito da enterotoxina termo-estável (STa) semipurificada no teste de depuração do carbono coloidal, realizado em camundongos (CBA x C₅₇B1/10)F₁.

Símbolos: (1) - 48 horas antes do carbono coloidal; (2) - índice de fagocitose K; (3) índice de fagocitose corrigido α ; (4) - UT: número de unidades tóxicas da enterotoxina STa; (5) - Enterotoxina STa aquecida a 100°C por 15 minutos; (6) - Enterotoxina STa autoclavada a 121°C por 15 minutos; (7) - Os resultados expressam a média aritmética \pm D.P. (desvio padrão) ($n = 5$); (8) - NS: Não significativo em relação ao resultado do grupo controle.

Grupo de animais	Inóculo (1) (0,2ml/animal)	K (2) (teste t: valor de p)	α (3) (teste t: valor de p)
A	M. de CAYE (1/5)	0,026 \pm 0,004 (7)	3,8 \pm 0,3 (7)
B	250 UT (4)	0,042 \pm 0,004 ($p < 0,001$)	5,7 \pm 0,3 ($p < 0,001$)
C	250 UT aquecida (5)	0,032 \pm 0,002 ($p < 0,01$)	4,3 \pm 0,2 ($p < 0,01$)
D	250 UT autoclavada (6)	0,028 \pm 0,003 ($p > 0,005$) NS (8)	3,6 \pm 0,5 ($p > 0,05$) NS

foi avaliado, neste tempo (48 horas antes) a capacidade de ação, quando a STa foi apenas aquecida a 100 °C por 15 minutos e quando autoclavada, 121°C por 30 minutos. Os resultados mostram (Tabela 1) que a enterotoxina, quando somente aquecida, apresenta valores de K e α , da depuração do carbono coloidal, também significativamente aumentados em relação ao grupo controle, demonstrando que a atividade desta sobre os macrófagos é capaz de resistir a fervura por 30 minutos. Todavia, quando a STa foi autoclavada (121°C, 30 min.), a atividade sobre os

macrófagos foi neutralizada, levando a valores de K e α comparáveis ao grupo controle.

As observações da massa dos órgãos, fígado e baço, indicam que o tempo de administração da toxina, 48 horas antes do carbono coloidal, corresponde também ao pico de hepto-esplenomegalia nos animais inoculados com a enterotoxina STa (Figuras 2 e 3).

Discussão

Verificamos que a inoculação da

enterotoxina STA semipurificada causou um estímulo na depuração do carbono coloidal. Este estímulo pode ser devido a ação da enterotoxina na proliferação de macrófagos, já que se tem observado que a ativação de macrófagos está associada a proliferação aumentada no número destas células localizadas no baço (5, 24, 27, 38, 39) sendo este fenômeno acompanhado de síntese de DNA (27).

Embora não tenhamos realizado contagem de macrófagos no baço dos animais inoculados com a enterotoxina STA é importante salientar, que houve também, no estudo da resposta humoral (42) uma esplenomegalia significativa destes animais em relação aos animais controles.

Nos mecanismos reguladores, indutores da ativação ou da supressão da resposta imune, parece existir a participação de mediadores intracelulares, tais como nucleotídeos cíclicos, em especial o AMP-c e GMP-c (40).

Estes mesmos nucleotídeos cíclicos estão envolvidos nos fenômenos diarréicos causados pelas toxinas de *E. coli*, na qual a LT induz um aumento de AMP-c (9, 16) ao passo que a STA leva a um aumento de GMP-c (12, 22).

Os níveis de nucleotídeos cíclicos parecem ter uma grande importância no que diz respeito a fagocitose pelos macrófagos.

Trabalhos realizados com drogas; que agem sobre a fosfodiesterase, uma das enzimas que controlam o nível intracelular de AMP-c, mostraram ter influência na fagocitose por macrófagos in vitro (29, 31, 34) e na depuração de partículas de carbono (21). As drogas capazes de aumentar o nível intracelular do AMP-c, através de um bloqueio da atividade enzimática, mostraram ser eficientes inibidores da fagocitose. Ao contrário, as drogas que ativam a ação da enzima, reduzindo os níveis de AMP-c, constituem um potente estímulo da fagocitose.

De acordo com a teoria Yin-Yang (17) o GMP-c promove eventos celulares que são contrários aos mediados pelo AMP-c.

Outros trabalhos tem demonstrado que a agregação de plaquetas estimula a fagocitose das partículas de carbono coloidal, fenômeno este que sofre uma

inibição (2) a medida que aumenta o AMP-c extracelular (6, 32) em contato com as plaquetas. Portanto uma outra hipótese para explicarmos as alterações observadas, seria que o GMP-c, aumentado por ação da enterotoxina STA, teria um efeito contrário ao do AMP-c, estimulando a agregação de plaquetas e, por conseguinte, aumentando a depuração do carbono coloidal. Para esta hipótese, embora elegante, baseando-se nos dados citados acima, teríamos que admitir, entretanto, que o GMP-c, localizado intracelularmente nas células que sofreram ação da enterotoxina, extravasaria, a fim de entrar em contato com as plaquetas.

Outra dúvida é se a enterotoxina STA poderia realmente ativar a guanil-ciclase dos linfócitos ou macrófagos, como já sugerido em trabalho anterior (42), aumentando o GMP-c nestas células, pois até pouco tempo, postulava-se que a enterotoxina STA seria capaz de ativar apenas a guanil-ciclase presente nas células das vilosidades intestinais, não interferindo nos níveis de GMP-c das células do estômago, pâncreas, pulmão, coração, rim e cortex cerebral (19). Experiências mais recentes, contudo, demonstraram que também células basófilas leucênicas de rato apresentavam um aumento na síntese de GMP-c quando em contato com a enterotoxina STA (28). Foi também observado, um aumento deste mesmo nucleotídeo em culturas de células CLL-6 e HeLa, após a incubação com a enterotoxina STA (23).

Não encontramos na literatura nenhum dado negando uma possível ação da enterotoxina STA nas células em questão, o que, com base nas observações acima, permite sugerir a possibilidade de que tais células, em contato com a enterotoxina STA possam responder com um aumento do GMP-c e respectivas consequências em relação às suas funções específicas. Colaborando com esta possibilidade estão os nossos resultados no estudo da resposta imune humoral (42) em presença da enterotoxina STA.

Todos os experimentos sobre o efeito da STA, aquecida ou autoclavada, na depuração do carbono coloidal são compatíveis com o que se conhece sobre a inativação biológica da STA pelo calor, sugerindo fortemente que os nossos

Figura 2 - Efeito da enterotoxina termo-estável (Sta), 250UT por animal, sobre o peso (g) médio ($n=8$) do baço de camundongos (CBA x B1/10)F1 inoculados com carbono coloidal. Cada ponto representa a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 8 animais. Animais controle (---). Animais inoculados com a enterotoxina Sta (—).

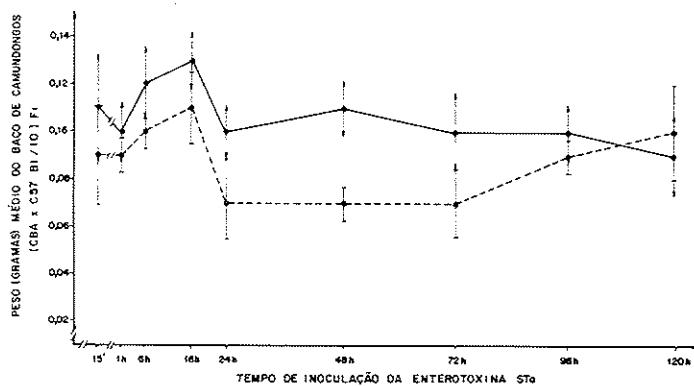
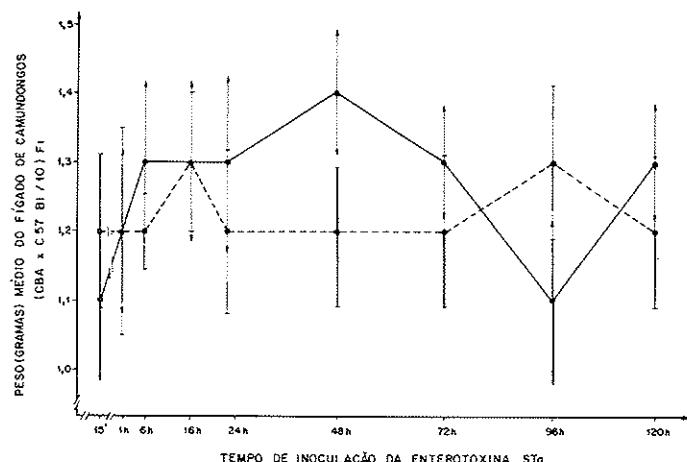


Figura 3 - Efeito da enterotoxina termo-estável (Sta), 250UT por animal, sobre o peso (g) médio ($n=8$) do fígado de camundongos (CBA x B1/10)F1 inoculados com carbono coloidal. Cada ponto representa a média aritmética ± 1 D.P. (desvio padrão) de grupos de 8 animais. Animais controle (---). Animais inoculados com a enterotoxina Sta (—).



resultados foram uma consequência do efeito da enterotoxina sobre as células envolvidas na resposta imune, fatos estes também demonstrados em trabalho anterior (42).

Summary

Study in mice (CBA x C57B1/10)F1 of the influence of thermostable (Sta) enterotoxin from Escherichia coli in phagocytosis

Mice (CBA x C57B1/10)F1 were used in order to study the phagocytic activity of their macrophages, after the inoculation into the animals of the thermostable (Sta) enterotoxin of *Escherichia coli*, obtained from human strain (O128 serogroup) and semipurified accordingly to Ricci e col. (1982). For this purpose the clearance of the colloidal carbon was used in mice which had been inoculated with 250 toxic units (UT) of Sta, within different intervals of time. The results showed that 250UT of Sta increased the rate of the depuration of colloidal carbon when the toxin was inoculated 24, 48, 72 and 96 hours before the injection of the colloidal substance. With regard to inoculations made either before or after these times no significant effect was observed in the clearance of the colloidal carbon and the injection of Sta 48h before the colloidal carbon, corresponded to the peak of its depuration.

Referências Bibliográficas

1. Ainto, S.; Takao, T.; Shimonishi, Y.; Hara, S.; Takeda, Y. & Miwatani, T. - Ammino acid sequence of a heat-stable enterotoxins produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.*, 129:257-263, 1982.
2. Aken, W.G. Van; Goote, Th.M. & Vreeken, J. - Platelet aggregation: an intermediary mechanism in carbon clearance. *Scand. Haemat.*, 5:333, 1968.
3. Alderete, J.F. & Robertson, D.C. - Purification and chemical characterization of heat-stable enterotoxin produced by porcine strain of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 19:1021-1030, 1978.
4. Biziozzi, G.; Benacerraf, B.; Greemach, F.; Halpern, B.; Levaditi, J. & Rist, N. - Etude de l'activite granulopexique du SRE and cours de l'infection tuberculeuse experimentale de la souris. *Ann. Inst. Pasteur*, 87:291, 1954.
5. Biziozzi, G.; Stiffel, C.; Halpern, B. & Mounton, D. - Lack of action of serum opsonins in phagocytosis on inert particles by cells of RES. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112:1017, 1963.
6. Born, G.V.R. & Cross, M. - Effect of ADP on the concentration of platelets in circulating blood. *Nature (London)*, 197:974, 1963.
7. Chan, S.K. & Gianella, R.A. - Ammino acid sequence of heat-stable enterotoxins produced by *Escherichia coli* pathogenic from man. *J. Biol. Chem.*, 256:7744-7746, 1981.
8. Dean, A.G.; Ching, Y.C.; Willians, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1973.
9. Evans, D.G.; Evans, D.J.Jr. & Gorbach, S.L. - Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxin activity by the vascular permeability factor assay. *Infect. Immun.*, 8:731-735, 1973.
10. Evans, D.J.Jr.; Evans, D.G.; Richardson, S.H. & Gorbach, S.L. - Purification of polymyxin-released, heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis. Suppl.*, 133:897-9102, 1976.
11. Feldmann, M.R. & Erb, P. - Macrophage-lymphocyte interactions in immune induction. *Inst. Rev. Cytol.*, 60:149, 1979.
12. Field, M.; Graf, J.H.Jr.; Laird, W.J. & Smith, P.L. - Heat stable enterotoxin of *Escherichia coli*: In vitro effect on guanylate-cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 75:2800, 1978.
13. Finazzi-Agro, A.; Conti, P.; Hoffman, M.; Angeletti, P.V. & Trends, - Activation of lymphocytes by H2O. In: *Inflammation Research I*, Edited by G.P. Velo, pp.220-223, 1980.

14. Franceschi, A.P.; Pestana de Castro, A.F.; Serafim, M.B. & Pustighlioni, L. Neto - Estudos comparativos entre o teste de alga ligada no intestino de coelho e do camundongo recém-nascido na detecção da enterotoxina termoestável (ST) produzida por *Escherichia coli*. Rev. Microbiol. (São Paulo), 8:123-128, 1977.
15. Gianella, F.A. & Drake, K.W. - Effect of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin on intestinal cyclic nucleotide metabolism and fluid secretion. Infect. Immun., 24:19-23, 1979.
16. Gill, D.M.; Evans, D.G. & Evans, D.J. Jr. - Mechanism of activation of adenylyl cyclase in vivo by polymyxin released heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. Suppl., 133:S103-S107, 1976.
17. Golberg, N.D.; Daddok, M.K.; Dunham, E.; Lopez, C. & Hadden, J.W. - The Yin-Yang hypothesis is of biological control: opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP in the regulation of proliferation and other biological processes. In: Clarkson, B.; Besregal, R., eds.: The Cold Spring Harbor Symposium of the regulation of proliferation in animal cells. New York Academic Press, 609-625, 1974.
18. Goodwin, J.S.; Messner, R.P. & Peake, G.T. - Prostaglandin suppression of mitogen-stimulated lymphocytes in vitro. J. Clin. Invest., 62:753-760, 1978.
19. Greenberg, R.N. & Guerrant, R.L. - *E. coli* heat-stable enterotoxin. Pharmac. Ther., 13:507-531, 1981.
20. Gyles, C.L. - Limitations of the infant mouse test for *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Can. J. Compar. Med., 43:371-379, 1979.
21. Hoebeke, J. and Franchi, G. - Influence of tetramisole and its optical isomers on the mononuclear phagocytic system. J. Reticuloendothel. Soc., 14:317, 1974.
22. Hugles, J.M.; Murad, F.; Chang, B. & Guerrant, R.L. - Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Nature, 271(5647):755-756, 1978.
23. Inoue, T.; Okamoto, K.; Moryama, T.; Takahashi, T.; Shimizu, K. & Miyama, A. - Effect of *Yersinia enterocolitica* ST on cyclic guanosine 3, 5'-monophosphate levels in mouse intestines and cultured cells. Microbiol. Immunol., 27(2):159-166, 1983.
24. Keller, R. - Major changes in lymphocytes proliferation evoked by activated macrophages. Cell Immunol., 17:542-551, 1975.
25. Keller, R. - Mononuclear phagocytes and antitumor resistance: a discussion. In: James, W.H. MC, eds. - The macrophage and cancer. Bride and A. Stuart, Econoprint. Edinburgh, p.33-48, 1977.
26. Keller, R. - Regulatory functions of macrophages. In: G.P. Velo, ed. Trends in Inflammation, Research I, p.90-99, 1980.
27. Kelly, L.S.; Brown, B.A. & Dobson, E.L. - Cell division and phagocytic activity in liver reticuloendothelial cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110:555, 1962.
28. Knoop, F.C. & Thomas, D.D. - Stimulation of calcium uptake and cyclic GMP synthesis in rat basophilic leukemic cells by *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. Infect. Immun., 41:971-977, 1983.
29. Mariano, M. and Malucelli, B.E. - Defective phagocytic ability of epithelioid cells reversed by levamisole. J. Path., 130:33-36, 1980.
30. Mosier, D.E. - A requirement for two cell types for antibody formation in vitro. Science, 158:1573, 1967.
31. Oliveira-Lima, A.; Javierre, M.Q.; Dias da Silva, W. and Sette Camara, D. - Immunological phagocytosis: Effect of drugs on phosphodiesterase activity. Experientia, 30:945-946, 1974.
32. Regoli, D. & Clark, U. - Prevention by adenosine of the effect of adenosine diphosphate on the concentration of circulating platelets. Nature (London), 197:974, 1963.
33. Ricci, L.C.; Pestana de Castro, A.F. & Rangel, H.A. - Purificação da enterotoxina termo-estável (ST) de *Escherichia coli*. Rev. Microbiol., 13(4):359-366, 1982.
34. Schereiber, A.D. and Parsons, J.N. -

- Effect of levamisole on the human monocyte IgG receptor. *J. Immunol.*, 118:1119-1121, 1977.
35. Serafim, M.B.; Castro, A.F.P.; Reis, M.H.L. dos & Trabulsi, L.R. - Passive immune hemolysis for the detection of heat-labile enterotoxin produced by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 24:606-610, 1979.
36. Staples, S.J.; Asher, S.E. & Gianella, R.A. - Purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by a strain of *E. coli* pathogenic for man. *J. Biol. Chem.*, 255:4716-4721, 1980.
37. Stephen, J. & Pietrowski, R.A. - Bacterial Toxins. In: Thomas Nelson and Sons LTD, eds., England, p.104, 1981.
38. Stiffel, C.; Mounton, D. & Biozzi, G. - Kinetics of the phagocytic function of reticuloendothelial macrophages *in vivo*. In: Ralph van Furth, ed., Mononuclear Phagocytes, 1970.
39. Stuart, A.E. - Structural and function effects of lipids on the RES. In: C.N.R.S. ed., - Role du SRE dans l'immunité antibactérienne et antitumorale. Paris, 1963.
40. Watson, J. - The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis. *J. Exp. Med.*, 141:97, 1975.
41. Whipp, S.C.; Moore, H.W. & Argenzio, R.A. - Comparison of enterotoxic activities of heat-stable enterotoxins from class 1 and 2 *Escherichia coli* of swine origin. *Infect. Immun.*, 31:245-351, 1981.
42. Zucato, M.R.L.; Dawood, F.A.; Ricci, L.C.; Costa, M.G. & Pestana de Castro, A.F. - Modulation action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (STa) on the humoral immune response. *Med. Microbiol. Immunol.*, 177:219-228, 1988.

INTOXICAÇÃO POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS PROVOCADA POR CARNE DE PERU DEFUMADA

Alexandre Soares Rosado
 Katia Regina Araújo da Silva
 Rogério Luis da Rocha Seixas
 Marco Antônio Lemos Miguel
 & João Carlos de Oliveira Tórtora

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

Resumo

Carne de peru defumada preparada numa confeitaria do bairro de Laranjeiras, RJ, apresentando $4,0 \times 10^7$ *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico/g, provocou intoxicação em 4 pessoas de mesma família.

No Brasil, durante as comemorações de fim de ano, o consumo de carnes aumenta, o que juntamente com o início do verão, favorece a ocorrência de intoxicações alimentares. A fiscalização sanitária fica prejudicada, principalmente com relação aos alimentos pré-cozidos. Em geral, os casos envolvem um número reduzido de pessoas e ocorrem sem conhecimento das autoridades sanitárias, dificultando o seu controle. Em 1988, cinco horas após a ceia de Natal, 4 pessoas de uma mesma família apresentaram náuseas, vômitos, diarréia e sudorese, não sendo possível identificar o alimento responsável pela intoxicação. Os sintomas regrediram duas horas após medicação anti-emética e anti-espasmolítica. Uma semana após, duas pessoas anteriormente intoxicadas voltaram a apresentar os mesmos sintomas, sugerindo que a carne de peru, consumida nas duas ocasiões, fosse a responsável pela intoxicação. O alimento foi obtido pronto para o consumo numa confeitaria do bairro de Laranjeiras, RJ, sendo o restante congelado após a ceia e, posteriormente, consumido adicionado de maionese. Os dados epidemiológicos permitiram a suspeita de uma intoxicação por *S. aureus* ou *B. cereus*. O alimento refrigerado (13,5g) foi homogeneizado e diluído em soro

fisiológico estéril, no dia do seu recebimento no laboratório, de modo a serem obtidas diluições entre 10^{-1} e 10^{-5} . Os meios agar métodos padrões (Merck 5463), agar manita-sal-vermelho fenol (Merck 5404), agar Baird Parker (Merck 5406), agar nutriente adicionado de manita (1%), gema de ovo (2,5%) e indicador de Andrade (1%), com pH 7,0 foram semeados em superfície, sendo o primeiro para contagem padrão de bactérias mesófilas, os dois seguintes para contagem e isolamento de *S. aureus* e o último para contagem e isolamento de *B. cereus*. A incubação foi a 37°C/24h. A contagem padrão de bactérias mesófilas evidenciou $5,9 \times 10^7$ UFC/g e a contagem de *S. aureus* em agar manita-sal-vermelho fenol e agar Baird Parker, em média, resultou em $4,0 \times 10^7$ UFC/g. No meio utilizado para contagem de *B. cereus* todas as colônias manita e lecitinase positivas foram caracterizadas como *S. aureus*, em número compatível com o encontrado em agar manitol-sal-vermelho fenol e agar Baird Parker. Seis colônias suspeitas de *S. aureus* foram isoladas de diferentes meios e identificadas pelos testes de fermentação do manitol e coagulase, sendo enviadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Microbiologia da UFRJ. Por cortesia da Dra. Alba Lúcia Noleto todas foram caracterizadas como produtoras de enterotoxina tipo A.

Concluimos que a presente intoxicação foi causada por carne de peru defumada, contaminada com *S. aureus* produtor de enterotoxina tipo A, e que a contaminação provavelmente ocorreu no próprio estabelecimento comercial, após o preparo, uma vez que após ter sido adquirido o alimento foi consumido num espaço de tempo curto, incompatível com a proliferação bacteriana. É provável que outros casos tenham ocorridos, uma vez que diversos alimentos cárneos foram processados e comercializados pelo estabelecimento, naquela ocasião.

Summary

Cured turkey sold at a candy shop in Laranjeiras, RJ, containing $10,0 \times 10^7$ enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*/g caused food poisoning in four members of a same family.

Recebido para publicação em 27/2/89

**ESCHERICHIA COLI EM PRÓDUTOS CÁRNEOS COMERCIALIZADOS EM LONDRINA - PR. I -
FREQUÊNCIA DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATOGÉNICA CLÁSSICA (EPEC)**

Catarina M. Petri
Lúcio A.F. Antunes

Deptº de Tecnologia de Alimentos e
Medicamentos
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Estadual de Londrina
Caixa Postal 6006
86051 Londrina PR, Brasil

& Halha O. Saridakis

Deptº de Patologia Geral
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina
Caixa Postal 6006
86051 Londrina PR, Brasil

Resumo

O presente estudo foi realizado para verificar a frequência de linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica (EPEC) em 100 amostras de carne moída de segunda qualidade e 93 amostras de quibe cru. Das 193 amostras de alimentos analisados 93,78% continham *E. coli*, sendo que 8,84% apresentaram algum sorogrupo de EPEC. Em 7,2% das amostras de carne moída de segunda foram evidenciados os sorogrupo 0₂₆, 0₁₁₉ e 0₁₂₅. Em 10,71% das amostras de quibe cru foram isoladas os sorogrupo 0₂₆, 0₁₄₂, 0₅₅ e 0₁₂₇. As cepas de EPEC isoladas apresentaram resistência múltipla a no máximo três das 15 drogas testadas. A ampicilina foi a droga com maior população de EPEC resistente (68,75% das EPEC isoladas) seguida da tetraciclina (43,75%). A população de EPEC estudada mostrou sensibilidade acima de 93% para as outras drogas testadas, exceção à gentamicina (81,25%).

Introdução

Escherichia coli enteropatogênica clássica (EPEC) tem sido descrita desde 1945 (3) como causadora de diarréia em crianças. Embora se admita que as EPEC são patogênicas apenas para crianças com, principalmente, até 6 meses de idade, alguns autores (5, 6, 16, 17, 20) sugerem que possam causar distúrbios gastrointestinais também em adultos.

O mecanismo de patogenicidade das EPEC ainda não está totalmente elucidado. Sabe-se, no entanto, que as cepas de EPEC necessitam de aderir e proliferar na mucosa intestinal do hospedeiro para manifestarem sua

patogenia (1, 6, 17). Vários autores têm pesquisado a capacidade de alguns sorogrupo de EPEC para produzir uma citotoxina termolábil, semelhante a Shigatoxina (4, 18, 21).

Os alimentos, principalmente os de origem animal, geralmente se apresentam contaminados por *E. coli* e por isto podem se tornar veículos potenciais de linhagens patogênicas desse microrganismo para o homem (15). Por outro lado, pouco se sabe a respeito da frequência de EPEC em alimentos, embora os sorogrupo 0₂₆, 0₁₂₅, 0₁₁₁ já tenham sido descritos em vários alimentos (5, 9, 13, 20) os quais, às vezes, estavam envolvidos em surtos de diarréia.

Considerando-se que a carne moída é

muito utilizada no preparo de vários alimentos e que o quibe é uma das formas em que tal produto é consumido, o objetivo desta pesquisa foi investigar a frequência de *Escherichia coli* enteropatogênica clássica em carne moída de segunda qualidade e quibe cru e assim determinar o papel destes alimentos na disseminação desse patógeno para o homem.

Material e Métodos

Amostras de alimentos - Foram analisadas 100 amostras de carne bovina moída de segunda qualidade e 93 amostras de quibe cru. Estes alimentos foram obtidos em casas de carnes e supermercados, considerados de bom nível higiênico da cidade de Londrina - PR.

Isolamento e identificação de *E. coli* - Para o isolamento de *E. coli* foi empregada a técnica de enriquecimento proposta por Sack e col. (19). Assepticamente, 25 gramas de cada amostra eram adicionadas a 225ml de caldo Mac Conkey e homogeneizadas em agitador metabólico (modelo Dubnoff) a 120 ciclos/minutos durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Após a homogeneização as amostras eram incubadas a 37°C por 20 horas. A seguir, uma alíquota equivalente a 0,01ml desta cultura era transferida para 30ml de caldo lauril triptose, que era incubado a 44°C por 20 horas.

A partir do crescimento em caldo lauril triptose eram feitas semeaduras em duplicatas em agar Mac Conkey e as placas incubadas a 37°C por 18 horas. Ao final do período de incubação, selecionavam-se, em média, para cada amostra de alimentos, 5 colônias fermentadoras de lactose e 1 colônia não fermentadora. A identificação bioquímica das colônias selecionadas foi feita segundo recomendação de Edwards & Ewing (7), utilizando-se os meios de cultura simplificados introduzidos por Toledo e col. (24, 25). Foram isoladas 510 colônias de *E. coli* das amostras de carne moída e 414 das amostras de quibe cru.

Pesquisa de EPEC - As 924 colônias de *E. coli* isoladas foram submetidas a soroaglutinação em lâmina, de acordo

Tabela 1 - Frequência de aparecimento de diferentes sorogrupo de *E. coli* enteropatogênica clássica isolados de amostras de carne moída de segunda e quibe cru.

Símbolos: K nº: número da amostra de quibe cru; C nº: número da amostra de carne moída de segunda a) amostra com mais de um sorogrupo de EPEC; b) % em relação ao total de EPEC isoladas.

	Sorogrupo isolados	Amostras positivas	Número de amostra(%) ^b
026	K 4		
	C 5		
	K 10		
	C 26		
	C 27	10	(62,5)
	K 40		
	C 41		
	K 43		
	K 60		
	C 79		
0142	K 8 ^a K 34	2	(12,5)
055	K 5	1	(6,25)
0119	C 37	1	(6,25)
0125	C 87	1	(6,25)
0127	K 8 ^a	1	(6,25)

com Edwards & Ewing (7) utilizando-se soros polivalentes e monovalentes. As cepas de *E. coli* que apresentaram aglutinação positiva eram novamente testadas por soroaglutinação em tubo (7) com soro diluído a 1:500.

Teste de sensibilidade a drogas - As cepas dos diferentes sorogrupo EPEC identificados foram submetidos ao teste de sensibilidade a drogas utilizando-se o método de difusão de Bauer e col. (2) e Sistema Coba (jul/85) da SBM (23).

Resultados e Discussão

Entre as 193 amostras dos alimentos analisados, 181 (93,78%) apresentaram-se contaminados com *E. coli*, sendo 97 (97%) das amostras de carne moída e 84 (90,32%) das amostras de quibe cru.

Tabela 2 - Frequência de isolamento de diferentes sorogrupos de *E. coli* enteropatogênica clássica em amostras de carne moída de segunda e quibe cru^a.
 Símbolos: a) foram consideradas apenas as amostras de alimentos com *E. coli*; b) a mesma amostra foi considerada para os sorogrupos 0142 e 0127; N.A. número de amostras.

Sorogrupo	Carnemoída		Quibe cru		Total dos sorogrupos de EPEC	
	N.A.	%	N.A.	%	N.A.	%
026	5	- 5,15	5	- 5,95	10	- 5,53
0142	0	- 0	2b	- 2,38	2	- 1,11
055	0	- 0	1	- 1,19	1	- 0,55
0119	1	- 1,03	0	- 0	1	- 0,55
0127	0	- 0	1b	- 1,19	1	- 0,55
0125	1	- 1,03	0	- 0	1	- 0,55
Total de EPEC/Tipo de alimento	7	- 7,20	9 ^b	- 10,71	16	- 8,84
Total de amostras analisadas	100		93		193	

Tabela 3 - Modelos de resistência a drogas antimicrobianas apresentados por sorogrupos de *E. coli* enteropatogênicas clássicas isoladas de carne moída de segunda e quibe cru.

Símbolos: -- = nenhuma cepa com tal modelo de resistência; Tt = tetraciclina; Ap = ampicilina; Ge = gentamicina; Su = sulfadiazina; Cl = cloranfenicol; Ka = canamicina.

Modelos de resistência	026	055	0119	0125	0127	0142
Cl Tt Su	1	--	--	--	--	--
Tt Ap	2	--	1	--	--	1
Ap Ka	1	--	--	--	--	--
Ap Ge	1	1	--	--	--	--
Ap	1	--	--	1	1	1
Ge	1	--	--	--	--	--
Tt	2	--	--	--	--	--
Sensíveis a todas as drogas	1	--	--	--	--	--
Total de cepas por sorogrupo	10	1	1	1	1	2

Foram isoladas 16 cepas de *E. coli* enteropatogênica clássica, pertencentes a 6 diferentes sorogrupo. De uma mesma amostra de quibe cru foram isolados 2 sorogrupo diferentes.

Na Tabela 1 estão apresentados os diferentes sorogrupo de EPEC isolados das amostras de carne moída e de quibe cru. Na Tabela 2 estão apresentados os dados referentes a frequência total de EPEC por tipo de alimento, bem como a frequência de isolamento de cada sorogrupo de EPEC entre as amostras de alimentos com *E. coli*.

O sorogrupo 026 foi o mais frequentemente isolado, representando 62,5% (Tabela 1) das EPEC isoladas. Os estudos deste sorogrupo têm se tornado importante nos últimos anos, já que algumas cepas desses sorogrupo isolados de fezes diarréicas humanas, têm se mostrado capazes de produzir uma citotoxina, chamada VERotoxina (4, 14, 21).

Como mostram as Tabelas 2 e 3, os demais sorogrupo de EPEC apareceram com menor frequência. Todos os sorogrupo isolados neste trabalho, já foram anteriormente relatados em alimentos (9, 12, 13, 15).

A incidência de EPEC em alimentos não é muito estudada, sendo poucos os trabalhos que relatam a observação desse patógeno entre os diversos tipos de alimentos. Porém, pode-se notar que a frequência de EPEC em alimentos de origem animal é bastante baixa (9, 10, 13).

Neste trabalho a frequência de amostras contaminadas por algum sorogrupo de EPEC foi de 8,84%, considerando-se o total das amostras de carne moída e quibe cru analisadas (Tabela 2). Esses resultados traduzem um fato significativo, já que os sorogrupo de EPEC aqui isolados têm sido relacionados com casos de gastroenterites tanto em crianças como em adultos por mecanismos não totalmente esclarecidos (5, 6, 14, 16, 17, 21).

Os resultados do teste de sensibilidade a drogas apresentados pelos diferentes sorogrupo de EPEC estão apresentados nas Tabelas 3 e 4. Das 16 cepas de EPEC isoladas apenas uma apresentou resistência multipla a no máximo 3 das 15 drogas empregadas. Sete cepas de diferentes sorogrupo

Tabela 4 - Populações sensível e resistente entre cepas de *E. coli* enteropatogênicas isoladas de carne moída de segunda e quibe cru.

Droga	Sensível nº	Sensível %	Resistente nº	Resistente %
Cloranfenicol	15	97,75	1	6,25
Tetraciclina	9	56,25	7	43,75
Estreptomicina	16	100,00	0	0,00
Ampicilina	5	31,25	11	68,75
Ac. nalidíxico	16	100,00	0	0,00
Canamicina	15	93,75	1	6,25
Gentamicina	13	81,25	3	18,75
Polimixina B	16	100,00	0	0,00
Amicacina	16	100,00	0	0,00
Sulfadiazina	15	93,75	1	6,25
Trimexazol	16	100,00	0	0,00
Carbenicilina	16	100,00	0	0,00
Cefalotina	16	100,00	0	0,00
Tobramicina	16	100,00	0	0,00

apresentaram resistência a 2 drogas e 7 foram resistentes a uma droga. Apenas uma cepa de EPEC foi sensível a todas as drogas. As cepas de sorogrupo 026 apresentaram diversos modelos de resistência (Tabela 3).

Observando-se a Tabela 4, pode-se notar que nenhuma cepa de EPEC foi resistente a estreptomicina, carbenicilina, cefalotina e tobramicina. A ampicilina foi a droga com maior população de *E. coli* resistente (68,75%) seguida da tetraciclina (43,75%). Com relação às demais drogas a população sensível esteve acima de 93% com exceção à gentamicina (82,30%).

Tem sido notado ultimamente o aumento da população de bactérias intestinais, isoladas de diferentes fontes, resistentes a várias drogas antimicrobianas e em especial a tetraciclina e ampicilina (8, 11, 22). Este aumento de resistência microbiana a tais drogas pode ser atribuído ao uso abusivo de antibióticos, tanto na terapêutica humana como animal, ou ainda como aditivo de rações para promover o crescimento animal.

Considerando-se todos os aspectos acima mencionados, parece pouco claro o papel dos alimentos na disseminação de *E. coli* enteropatogênica clássica, responsável por surtos de diarréia no homem. Portanto, torna-se necessário dispensar maiores atenções para o

estudo da frequência desse microrganismo em alimentos de diferentes origens e principalmente na maneira pela qual esse patógeno exerce sua ação patogênica.

Summary

Escherichia coli in meat products commercialized in Londrina - PR, I - Frequency of classical enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)

A survey was conducted to know the frequency of classical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in 100 samples of second grade ground beef and 93 samples of keebe. Of all the analysed samples 93.7% were contaminate with *E. coli* and from this total 8.84% had EPEC. The serogroup O₂₆, O₁₁₉ and O₁₂₅ were isolated from 7.2% the ground beef samples and 10.71% of the raw keebe samples showed the serogroup O₂₆, O₁₄₂, O₅₅ and O₁₂₇. The isolated EPEC strains exhibited multiple resistance to a maximum of 3 drugs of the 15 drugs tested in this study. EPEC strains showed maximum resistance to ampicillin 968.75% of isolated EPEC strains followed by tetracyclin (43.25%). For the others drugs tested except in case of gentamycin (81.25%), the EPEC population showed sensibility above 93%.

Referências Bibliográficas

1. Baldani, M.M.; Kaper, J.B.; Levine, M.M.; Candy, D.C.A. & Moon, H.W. - Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2:534-538, 1983.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.N.W.; Sherris, G.J. & Turck, M. - Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45:493-496, 1966.
3. Bray, J. - Isolation of antigenically homogeneous strain of *Bacterium colineopolitanum* from summer diarrhea of infants. *J. Pathol. Bacteriol.*, 57:236-247, 1945.
4. Cleary, T.G.; Mathewson, J.J.; Faris, E. & Pickring, L.K. - Shigalike cytotoxin production by enteropathogenic *Escherichia coli* serogroups. *Infect. Immun.*, 47:335-337, 1985.
5. Costin, I.D.; Voicelescu, D. & Gorcea, V. - An outbreak of food poisoning in adults associated with *Escherichia coli* serotype 86:B₇:H₃₄. *Path. Microbiol.*, 27:68-78, 1964.
6. Edelman, R. & Levine, M.M. - Summary of workshop on enteropathogenic *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de alimentos. *Rev. Microbiol.*, São Paulo, 16:49-55, 1985.
7. Frank, J.F. & Marth, E.H. - Survey of soft and semisoft cheese for presence of fecal coliforms and serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Food. Prot.*, 41:198-200, 1978.
8. Furtado, J.S. & Pereira, A.D. - Sistema Coba: cepas resistentes a antimicrobianos em 1984,.São Paulo. Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1985. 20p.
9. Gelli, D.S.; Tachibana, T.; Oliveira, I.R.; Zamboni, C.Q.; Pacheco, J.A. & Spiteri, N. - Condições higiênico-sanitária de hortaliças comercializadas na cidade de São Paulo, Brasil. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 39:37-43, 1979.
10. Hall, H.E.; Brown, D.F. & Lewis, K.H. - Examination of market foods to coliform organisms. *Appl. Microbiol.*, 15:1062-1069, 1967.
11. Johnson, W.M.; Lior, H. & Bezanson, G.S. - Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis in Canada. *Lancet*, 1:76, 1983.
12. Kornacki, J.L. & Marth, E.H. - Foodborne illness caused by *Escherichia coli*: a review. *J. Food. Prot.*, 45:1051-1067, 1982.
13. Levine, M.M.; Bergquist, E.J.; Nalin, D.R.; Waterman, D.H.; Hornick, R.B.; Young, C.R.; Sotman, S. & Rowe, B. - *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*, 1:1119-1122, 1978.
14. Levine, M.M. & Edelman, R. - Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and

- pathogenesis. Epidemiol. Rev., 6:31-51, 1984.
- 18.08Brian, A.D. & Laveck, G.D. - Purification and characterization of *Shigella dysenteriae* 1 - like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun., 40:675-683, 1983.
- 19.Sack, R.B.; Sack, D.A.; Malzman, I.J.; Orskov, F. & Orskov, I. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* from food. J. Infect. Dis., 135:313-317, 1977.
- 20.Schoeder, S.A.; Caldwell, J.R.; Vernon, T.M.; White, P.C.; Granger, S.L. & Bennet, J.V. - A waterborne outbreak of gastroenteritis in adults associted with *Escherichia coli*. Lancet, 1:737-740, 1968.
- 21.Scotland, S.M.; Day, N.P. & Rowe, B. - Production of a cytotoxin affecting VERO cells by strains of *Escherichia coli* belonging to traditional enteropathogenic serogroup. Fems. Microbiol. Lett., 7:15-17, 1980.
- 22.Silva, M.M.; Yamamoto, M.A. & Severo, N.P.F. - Resistência a drogas, lisogenia e produção de colicinas e hemolisinas em amostras de *Escherichia coli* enteropatogênica. Rev. Microbiol., São Paulo, 14:254-258, 1983.
- 23.Sociedade Brasileiro de Microbiologia, Fontes comuns de erros no antibiograma. Bol. Coba, São Paulo, 2:3-5, jul., 1985.
- 24.Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - Mili: um meio para realização dos testes de motilidade indol e lisina descarboxilase. Rev. Microbiol., São Paulo, 13:230-235, 1982.
- 25.Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - EMP: uma modificação do meio de Rugai para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol., São Paulo, 13:309-315, 1982.

Recebido para publicação em 08/5/89

ESCHERICHIA COLI EM PRODUTOS CÁRNEOS COMERCIALIZADOS EM LONDRINA - PR. II - FREQUÊNCIA DE ESCHERICHIA COLI ENTEROTOXIGÊNICA (ETEC)

Catarina M. Petri
Lúcio A. F. Antunes

Deptº de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos
Centro de Ciências Agrárias
Universidade Estadual de Londrina
Caixa Postal 6001
86051 Londrina PR, Brasil

& Halha O. Saridakis

Deptº de Patologia Geral
Centro de Ciências Biológicas
Universidade Estadual de Londrina
Caixa Postal 6001
86051 Londrina PR, Brasil

Resumo

A capacidade toxigênica de 924 amostras de *Escherichia coli* isoladas de 100 amostras de carne moída de segunda qualidade e de 93 amostras de quibe cru foi pesquisada pelos testes de Dean e alça ligada de intestino de coelho para detecção de enterotoxina termoestável (ST). Os testes de imunohemólise passiva, imunohemólise radial e alça ligada de intestino de coelho foram utilizados para detecção de enterotoxina termolábil (LT). Nenhuma cepa de *E. coli* enterotoxigênica foi isolada dos alimentos analisados, embora 93% das amostras de carne moída de segunda e 90,32% das de quibe cru estivessem contaminadas por *E. coli*.

Introdução

Geralmente, as condições higiênico-sanitárias durante o abate de animais, transporte e comercialização da carne em nosso meio são precárias. Por isto é comum se observar, com frequência, a presença de *Escherichia coli* contaminando os alimentos de origem animal (7, 8, 12, 15, 17, 20).

A carne moída e o quibe cru, por serem submetidos a intensa manipulação, são alguns dos alimentos mais susceptíveis à contaminação microbiana.

A constatação de que um alimento está contaminado com *E. coli* é preocupante, considerando-se que se trata de um microrganismo de origem fecal e que apresenta linhagens

patogênicas para o homem e animais domésticos (11, 16, 19). Nas últimas décadas tem sido descrita a presença de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) produtoras de enterotoxina termoestável (ST) e/ou enterotoxina termolábil (LT) em diversos alimentos, os quais muitas vezes estão associados a surtos de toxininfecções alimentares (1, 8, 11, 15, 17).

Apesar da importância desse patógeno como causador de toxininfecções alimentares são poucos os dados existentes sobre a incidência de ETEC em alimentos no Brasil, especialmente na região de Londrina.

Considerando-se que a carne moída de segunda qualidade e o quibe cru são duas das formas de carne mais consumidas pela população, o objetivo

deste trabalho foi pesquisar a ocorrência de *Escherichia coli* enterotoxigênica nesses alimentos na cidade de Londrina-PR.

Material e Métodos

Amostras de alimentos - Foram analisadas 100 amostras de carne bovina moída de segunda qualidade e 93 amostras de quibe cru. Estas amostras foram obtidas semanalmente, durante nove meses em casas de carnes e supermercados considerados de bom nível higiênico na cidade de Londrina-PR.

Isolamento e identificação - Para o isolamento de *E. coli* foi empregada a técnica proposta por Sack e col (17). A identificação bioquímica das cepas de *E. coli* foi feita segundo Edwards & Ewing (3) pelos testes bioquímicos propostos por Toledo e col. (21, 22).

Determinação de toxigenicidade - A capacidade toxigênica das cepas de *E. coli* isoladas foi investigada através dos testes de Dean (2) e alça ligada de intestino de coelho (5) para detecção de enterotoxina ST. Na detecção de enterotoxina LT foram utilizados os testes de imunohemólise passiva em microplacas (14) e em tubo (6), imunohemólise radial (23) e o teste em alça de intestino de coelho (5).

Pesquisa de enterotoxina termoestável (ST) - Para o preparo de enterotoxina ST, cada colônia de *E. coli* isolada foi cultivada em tubo de ensaio 18x180mm, contendo 3ml de meio de Caye. Os cultivos foram realizados sob agitação, em agitador metabólico (modelo DUBNOFF) a 120 ciclos/minutos, durante 18 horas a 37°C. Após esse período as culturas eram centrifugadas a 8500g por 15 minutos. Os sobrenadantes obtidos constituíram-se nos extratos de cultura para se pesquisar a enterotoxina ST.

O teste de Dean baseia-se no acúmulo de líquido no lúmen intestinal de camundongos recém-nascidos, em 4 horas, provocado pela ação de enterotoxina ST. Para a realização desse teste, eram feitas misturas de extratos de cultura de no máximo 4

cepas de *E. coli* para um volume final de 1,0ml (os extratos misturados eram provenientes de cepas de *E. coli* isoladas de uma mesma amostra de alimento). A essas misturas adicionava-se 1 gota de solução de azul de Evans a 2% e 0,1ml destas misturas era injetado diretamente no estômago de cada camundongo de um grupo de 3 a 4 animais, de 2 a 4 dias. Após 4 horas os animais eram sacrificados e seus intestinos separados das carcaças, pesados e calculada a relação entre o peso dos intestinos e o peso das carcaças (Pi/Pc). Para os grupos de camundongos que apresentavam relação Pi/Pc maior ou igual a 0,070, o teste era repetido, com cada extrato, em camundongos e em alças ligadas de intestino de coelho.

O teste em alça ligada de intestino de coelho baseia-se no acúmulo de fluídos nas alças ligadas, provocado pela enterotoxina ST em 6 horas. Para a realização do teste, extratos de cada cepa isolada de *E. coli*, eram aquecidos em banho-maria fervente por 30 minutos. Posteriormente, 1ml dos extratos era inoculado nas alças ligadas de coelhos devidamente tratados. Decorrido 6 horas da inoculação, os animais eram sacrificados e verificado, para cada alça, a ocorrência de dilatação e calculada a relação entre volume de líquido/comprimento da alça (VL/Ca).

Os testes de toxigenicidade para toxina ST eram considerados positivos quando a relação Pi/Pc era maior que 0,085 e a relação VL/Ca era maior que 1,0. Foram sempre incluídos nos testes um controle ST positivo e um ST negativo.

Pesquisa de enterotoxina termolábil (LT) - A enterotoxina LT foi pesquisada em 2 etapas. Na primeira etapa foram utilizados os testes de imunohemólise passiva, modificado (IHP, m) por Ramos (14), em microplacas com fundo em U e de imunohemólise radial (IHR), segundo a metodologia proposta por Yano e col. (22). Na segunda etapa as cepas que apresentaram hemólise parcial nos testes anteriores eram submetidas aos testes de imunohemólise passiva em tubo (IHP, t) segundo Evans & Evans (6) e alça ligada de intestino de coelho, com leitura após 18 horas, de acordo com Evans e col. (5). Os extratos de cultura de *E. coli* foram testados

Tabela 1 - Distribuição de *E. coli* nas amostras de alimentos.

Amostra	Nº de amostras analisadas	Nº de amostras com <i>E. coli</i> (%)	Nº de colônias de <i>E. coli</i> estudadas
Carne moída	100	97 (97%)	510
Quibe cru	93	84 (90,32%)	414
Total	193	193 (93,78%)	924

individualmente, em cada uma das etapas.

Para a realização dos testes de IHP, m e IHP, t os extratos de cultura de *E. coli* eram obtidos por semeadura das cepas em tubo de ensaio 18x180mm contendo o meio de Caye inclinado, adicionado de 1,5% de agar e 90µg/ml de lincomicina (14). As culturas eram incubadas a 37°C e após 18 horas o crescimento bacteriano era ressuspensido pela adição de 1,5ml de solução salina estéril e 0,15ml de solução de polimixina a 2,2mg/ml, preparada em tampão de fosfato 0,04M, pH 6,7. As suspensões bacterianas eram incubadas por 15 minutos a 37°C, e em seguida centrifugadas a 8500xg por 15 minutos.

Para a realização dos testes de IHR e alça ligada de intestino de coelho o preparo dos extratos de cultura de *E. coli* era feito em tubos de ensaio 20/200mm, inoculando-se cada cepa de *E. coli* isolada em 3ml de meio de Caye. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação por 18 horas. Após este período, era adicionado a cada tubo, 0,3ml de solução de polimixina a 2,2mg/ml e as culturas incubadas por 15 minutos a 37°C, sendo em seguida centrifugadas a 8500xg por 15 minutos.

Os sobrenadantes obtidos pelas diferentes técnicas, constituiram-se nos extratos de cultura para pesquisa de enterotoxina LT.

Resultados e Discussão

Os resultados referentes ao isolamento de *E. coli* das amostras de carne moída de segunda qualidade e quibe cru estão apresentados na Tabela I.

Nenhuma das cepas de *E. coli* isoladas das amostras de carne moída e de quibe cru apresentou capacidade toxigênica.

De acordo com estudos realizados em

diversos países, a incidência de ETEC em alimentos é bastante variável. Danielsson e col. (1), analisando amostras de diversos alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções na Suécia encontraram em dois casos alimentos contendo ETEC, sendo que um dos alimentos envolvidos era rosbife. Escheverria e col. (4) nas Filipinas, em estudos com 51 amostras de alimentos de origem animal e Jiwa e col. (10) no Ceilão, com 68 amostras de alimentos de diferentes origens não isolaram cepas de *E. coli* com capacidade toxigênica.

Por outro lado, estudos realizados no Brasil (8, 15) e nos Estados Unidos (17) utilizando a mesma metodologia de isolamento de *E. coli* empregada neste trabalho, mostraram que a incidência de ETEC em alimentos de origem animal era de 5 a 10%, predominando as cepas de *E. coli* produtoras de enterotoxina LT.

Com base nesses dados, pode-se notar que a incidência de ETEC em alimentos recaí principalmente sobre os alimentos de origem animal que sofreram algum tipo de processamento. Esses alimentos durante as diferentes etapas do processamento estão sujeitos a condições diversas que podem favorecer o desenvolvimento de microrganismos patogênicos no produto final, tornando-o fonte desse patógeno.

É possível que a ausência de ETEC entre as amostras de carne moída de segunda qualidade e quibe cru estudadas esteja relacionada com algumas restrições apresentada na metodologia empregada. Segundo Mehlman & Romero (13), metodologia empregando altas temperaturas de incubação, ao redor de 44,5°C, a presença de agentes seletivos que geralmente são tóxicos às cepas patogênicas, e a lactose como única fonte de açúcar, criam condições inadequadas para a sobrevivência das cepas não patogênicas. Hill & Carlisle (9) demonstraram que o enriquecimento para *E. coli* em meios contendo lauril sulfato triptose a 44,5°C resultava em

perda do plasmídio responsável pela produção de enterotoxina e consequentemente diminuia a eficiência da metodologia rotineiramente empregada no isolamento de ETEC.

Também não foram detectadas cepas de ETEC entre 250 amostras de fezes de bezerros (de até 1 mês) com diarréia na região em estudo (18). No entanto, apesar de poucos dados regionais isso pode levar a supor que na região de Londrina a ocorrência de ETEC seja baixa ou ausente.

Embora não tenha sido observada a ocorrência de ETEC nos produtos estudados, acredita-se que os alimentos em geral representam um papel importante no elo de transmissão desse patógeno para o homem, sendo responsabilizados por vários surtos de diarréia em crianças e adultos.

Assim, pode-se concluir que é urgente a adequação e desenvolvimento de metodologia de isolamento e identificação de cepas de *E. coli* enterotoxigênica a partir de amostras de alimentos, para melhor elucidação do problema das toxinfecções alimentares por esse microrganismo.

Summary

Escherichia coli in meat products commercialized in Londrina-PR. II - Frequency of enterotoxigenic *Escherichia coli*

The toxigenic ability of 924 strains of *Escherichia coli* isolated from 100 samples of second grade and from 93 samples of raw keebe was investigated by Dean test and rabbit ileal loop test to detected enterotoxin ST. Passive immune hemolysis and rabbit ileal loop test were used to detect enterotoxin LT. None enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strain was isolated from foods samples investigated, although 97% of the second grade ground beef and 90,32% of raw keebe were contaminated by *Escherichia coli*.

Referências Bibliográficas

1. Danielsson, M.L.; Mollby, R.; Brag, H.; Hansson, N.; Jonsson, P.; Olson, E. & Wadstrom, T. - Enterotoxigenic enteric bacteria in food and outbreak of food borne diseases in Sweden. J. Hyg., 83:33-34, 1979.
2. Dean, A.G.; Ching, Y.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. J. Infect. Dis., 125:407-411, 1972.
3. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3^a ed., Minneapolis, Burgess Publishing, 1972. 362p.
4. Escheverria, P.; Verhaert, L.; Basaca-Servilha, V.; Bansow, T.; Cross, J.; Orskov, F. & Orskov, I. - Search of heat-labile enterotoxigenic *Escherichia coli* in humans, livestock, food and water in a community in the Philippines. J. Infect. Dis., 138:87-90, 1978.
5. Evans, D.G.; Evans Jr., D.J. & Pierce, N.F. - Differences in the response of rabbit small intestine to heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. Infect. Immun., 7:873-880, 1973.
6. Evans Jr., D.J. & Evans, D.G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. Infect. Immun., 16:604-609, 1977.
7. Foster, J.F.; Fowler, J.L. & Ladiges, W.C. - A bacterial survey of raw ground beef. J. Food Prot., 40:790-794, 1977.
8. Franco, B.D.G.M.; Guth, B.E.C. & Trabulsi, L.R. - Isolamento e características de cepas de *Escherichia coli* enteropatogênica isoladas de alimentos. Rev. Microbiol., São Paulo, 16:49-55, 1985.
9. Hill, W.E. & Carlisle, C.L. - loss of plasmids during enrichment for *Escherichia coli*. Appl. Environm. Microbiol., 41:1046-1048, 1981.
10. Jiwa, S.F.H.; Krovacek, K. & Wadstrom, T. - Enterotoxigenic bacteria in food water from Ethjopian community. Appl. Environm. Microbiol., 41:1010-1019, 1981.
11. Kornack, J.L. & Marth, E.H. - Food borne illness caused by *Escherichia coli*: a review. J. Food. Prot., 45:1051-1067, 1982.
12. Leitão, M.F.F. - Microrganismos

- patogênicos na carne e derivados. Bol. Inst. Tecnol. Aliment., 59:15-45, 1978.
13. Mehlman, I.J. & Romero, A. - Enteropathogenic *Escherichia coli*: methods for recovery from foods. Food. Technol., 36:73-79, 1982.
14. Ramos, E.C.B. - Padronização e avaliação de técnica de imunohemólise passiva - PIH - em micropiaca para detecção de enterotoxina LT de *Escherichia coli*. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1983. (Tese de Mestrado).
15. Reis, M.H.L.; Vasconcelos, J.C. & Trabulsi, L.R. - Prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* in some processed raw food from animal origin. Appl. Environm. Microbiol., 39:270-271, 1980.
16. Sack, R.B. - Human diarrheal disease by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol., 29:333-353, 1975.
17. Sack, R.B.; Sack, D.A.; Malzman, I.J.; Orskov, F. & Orskov, I. - Enterotoxigenic *Escherichia coli* from food. J. Infect. Dis., 135:313-317, 1977.
18. Saridakis, H.O.; Marana, E.R.M. & Ferreira, A.J.P. - Pesquisa de *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC) em bezerros com diarréia, na região de Londrina. In: 11º Encontro de Pesquisas Veterinárias, Jaboticabal (6 a 7 de novembro), Resumos:34, 1986.
19. Smith, H.W. & Halls, S. - Observation by the ligated intestinal segments and oral inoculation methods on *Escherichia coli* infections in pigs, calves, lambs and rabbits. J. Pathol. Bacteriol., 93:499-529, 1967.
20. Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - MILI: um meio para a realização dos testes de motilidade, indol e lisina descarboxilase. Rev. Microbiol. São Paulo, 13:230-235, 1982.
21. Toledo, M.R.F.; Fontes, C.F. & Trabulsi, L.R. - EPM: uma modificação do meio de Rugai para a realização simultânea dos testes de produção de gás a partir de glicose, H₂S, urease e triptofano desaminase. Rev. Microbiol., São Paulo, 13:309-315, 1982.
22. Yano, T.; Oliveira, M.S.; Fontes, C.F.; Almeida, A.C.P. & Castro,
- A.F.P. - Detection of heat-labile (LT) enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by the radial immune hemolysis test: a modification for clinical use. Med. Microbiol. Immunol., 171:171-178, 1982.

Recebido para publicação em 08/05/89

PREVALÊNCIA E DISTRIBUIÇÃO DE MICOBACTÉRIAS NAS ÁGUAS DE ALGUMAS REGIÕES DO ESTADO DE SÃO PAULO - BRASIL

Clarice Queico Fujimura Leite
Rubens Ferracini Junior
Deise Pasetto Falcão

Deptº de Ciências Biológicas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP
Caixa Postal 331
14800 Araraquara São Paulo SP

Hugo David
& Véronique Lévy Frébault

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

Resumo

A ocorrência de micobactérias em águas de diferentes regiões do Estado de São Paulo foi pesquisada em 302 amostras de origem diversa, como águas naturais (lago, rio, mina, poço artesiano e raso), águas tratadas (potável de torneira e piscina) e águas destinadas à criação de peixes (aquários e tanque de piscicultura). As amostras de águas provenientes de aquários apresentaram a maior frequência de positividade (88,6%), seguidas pelas amostras de águas de poços rasos (33,3%), de lagos e rios (29,4%), de piscinas (28,2%), de tanques de piscicultura (16,6%), de minas (12,5%) e de águas de torneira (4,2%). Não foram encontradas micobactérias em águas de poços artesianos. Das cepas isoladas, 63,3% foram caracterizadas como micobactérias de crescimento rápido e as demais como de crescimento lento. *M. fortuitum* esteve presente nos diversos tipos de águas, constituindo 36,7% das cepas isoladas. Outras micobactérias potencialmente patogênicas foram encontradas em menor frequência. Verificou-se que a maioria das águas examinadas estavam contaminadas por micobactérias potencialmente patogênicas ou saprofíticas, sendo os principais reservatórios as águas que entram em contato com peixes e humanos como as de aquário e piscina.

Introdução

Apesar de sua descoberta datar do século XIX, somente em meados do século XX é que as chamadas micobactérias atípicas passaram a ser reconhecidas como agentes infecciosos, em casos de infecção nosocomial (3), de granuloma de piscina (18), infecção ganglionar (8), e de inúmeros casos de

micobacterioses disseminadas em pacientes portadores de AIDS (10) e naqueles submetidos à hemodiálise (13). Estes fatores motivaram os microbiologistas e médicos a voltarem maior atenção à esse grupo de patógenos oportunistas, presentes no solo, na poeira, na água e nos animais, renovando o interesse no estudo de sua ecologia, visando a

elucidação da rota de infecção humana a partir de fontes ambientais.

Um trabalho recente de revisão evidencia a água como reservatório importante de micobactérias atípicas (1). Estas podem sobreviver em aerosóis formados a partir das águas de piscinas e do mar (1). Em simulações laboratoriais, foi verificado que a inalação desses aerosóis contaminados, podem causar infecções pulmonares (17). Certas espécies, como *M. kansaii* e *M. xenopi*, são mais adaptadas a águas encanadas do que a águas naturais, sendo isoladas de numerosos locais hospitalares, como reservatórios de nebulizadores e máquinas de hemodiálise (17). A *M. marinum*, por sua vez, tem como reservatório particular as águas de piscina, tanques de piscicultura, aquários e águas marinhas (1).

Este trabalho tem como objetivo realizar em algumas regiões do Estado de São Paulo (Araraquara, Jaboticabal e Pirassununga) uma ampla investigação da presença da flora micobacteriana em águas doces de origens diversas, detectar espécies potencialmente patogênicas para o homem e as possíveis fontes de disseminação dessas espécies.

Material e Métodos

Amostras de água - Foram examinadas 302 amostras de águas classificadas em naturais (18 poços, 16 minas, 51 lagos e rios), tratadas (110 piscinas e 24 torneiras) e águas utilizadas na criação de peixes (35 aquários e 48 tanques de piscicultura). As coletas foram realizadas no período de novembro de 1984 a outubro de 1985 e de janeiro a novembro de 1987. As águas de piscina e as da rede pública foram coletadas conforme descrito anteriormente (12); as demais, em porções de um litro, sem adição de tiossulfato de sódio. As amostras foram identificadas e transportadas imediatamente ao laboratório, mantidas sob refrigeração até o início das análises, por período nunca superior a 6 horas.

Isolamento de micobactérias - Volume correspondente a 1 litro de cada amostra de água foi filtrado em

membranas de 0,45um. As membranas provenientes da filtração das águas de poços, de minas, de aquários e as águas tratadas, que supõe-se menos contaminadas, foram submetidas a tratamento previamente descrito (12, 13). As membranas provenientes de filtração de águas de lagos, rios e tanques de piscicultura, que teoricamente são mais contaminadas, foram incubadas por 6 horas em caldo - Infusão de Cérebro e Coração (Difco) a 35°C, visando a germinação de esporos (2), e posteriormente submetidas à descontaminação ácida (12). Os sedimentos ressuspensos foram semeados em duplicata em meio de Lowenstein-Jensen (L-J), em meio de L-J acrescido de 500ug/ml de actidione (Upjhon), para inibir o crescimento de bolores (7) e em meio de L-J adicionado de citrato férrico amoniacial (15mg/ml) para propiciar o desenvolvimento de *M. haemophilum* (6). Todos os tubos foram incubados às temperaturas de 30 e 37°C, com observação diária durante 7 semanas. Com a finalidade de se obter cultura pura, as colônias com características de Bacilo Álcool Ácido Resistente (BAAR), que se desenvolveram nos diferentes meios, foram ressemeadas em placas de Petri contendo meio de L-J, pela técnica da semeadura por esgotamento em espiral e incubadas à temperatura de origem. As colônias isoladas foram consideradas cepas puras e repicadas para novos tubos de L-J, para posterior identificação. Antes desta, nova verificação de ausência de contaminação foi realizada pela técnica de Kinyoun modificada (5).

Identificação das micobactérias - As cepas foram identificadas através dos métodos rotineiros empregados no laboratório de referência de micobactérias do Instituto Pasteur de Paris (5) e de outros recomendados por diferentes autores (15, 16). A identificação foi complementada pela análise do perfil de ácidos micólicos, de acordo com métodos descritos anteriormente (4, 14).

Resultados e Discussão

Das 302 amostras de águas

analisadas, foram isoladas 117 cepas de micobactérias. As diversas procedências e o número de cepas quer as de crescimento rápido (MCR), quer as de crescimento lento (MCL) por local de coleta, são apresentados na Tabela 1. Os reservatórios mais promissores foram os aquários e as piscinas, seguidos pelos tanques de piscicultura, lagos e rios, poços rasos, minas e águas de torneira. Nenhuma micobactéria foi isolada a partir de águas de poço artesiano. Goslee e Wolinsk (7) encontraram maior número de micobactérias em lagos e aquários, seguido em ordem decrescente de águas de piscinas, potável, rios e lagos.

Segundo Kazda (9), o grau de limpeza das águas é importante para a multiplicação das micobactérias, as quais crescem mal em ambientes onde proliferam outros microrganismos. Os resultados desta pesquisa confirmam essa observação, pois, a recuperação de micobactérias a partir de águas de tanques de piscicultura, que são altamente poluídas, foi cerca de 4 vezes inferior à de aquários.

Em relação às águas tratadas, os resultados mostram que a recuperação de micobactérias a partir de águas de piscina, que estão em contato com superfícies e secreções humanas, foi cerca de 18 vezes maior do que de águas de torneira. Este é um fato que chamou a atenção pois esperava-se isolar micobactérias em proporções semelhantes tanto nas águas de piscina como nas de torneira.

Observa-se também que houve predominância de micobactérias de crescimento rápido no total de amostras analisadas, porém das 36,7% de micobactérias de crescimento lento isoladas, 23,9% estavam presentes nas águas tratadas, indicando a preferência dessas bactérias pelas águas menos poluídas e sua resistência à cloração.

Na Tabela 2 estão listadas as espécies de micobactérias isoladas, de acordo com sua procedência. Apesar da adição de citrato férrico amoniacal ao meio de L-J, não foi isolada nenhuma *M. haemophilum*. Das 117 cepas analisadas, 45,3% podem ser consideradas potencialmente patogênicas. A maioria destas (94,2%) pertencem ao complexo *M. fortuitum*,

que é constituído por *M. fortuitum* e *M. chelonei*, agentes de abscessos localizados e crônicos (19), de infecções da córnea, e pulmonares, de linfadenites (17) e ocasionalmente de infecções disseminadas em pacientes submetidos a hemodiálise com fluidos contaminados (17). Chama-se ainda a atenção ao fato de bactérias deste complexo estarem presentes em grande número em águas relacionadas com peixes (aquários e tanques de piscicultura, lagos e rios).

Outros patógenos oportunistas, como *M. marinum*, *M. avium intracellulare* e *M. scrofulaceum*, foram isolados de águas de piscinas. Segundo du Moulin e Stottmeier (17), 95% de infecção micobacteriana dos nódulos linfáticos da garganta de crianças, são causadas por bactérias do complexo *M. avium intracellulare* ou *M. scrofulaceum* e a contaminação ocorre pela ingestão de água contaminada. As micobactérias do complexo *M. terrae* foram isoladas tanto de águas naturais como daquelas destinadas à criação de peixes, num total de 8 vezes. Apesar de serem consideradas saprófitas ambientais, tem sido relacionadas à patologia humana (19). Também foram isoladas outras micobactérias, como *M. gordonaiae*, *M. smegmatis* e outras de crescimento rápido.

Para o estudo das características bioquímicas e de perfil de ácidos micólicos, as micobactérias foram reunidas em 4 grupos de acordo com o tempo de crescimento e produção de pigmento. No primeiro grupo (Tabela 3) foram incluídas espécies de crescimento rápido não pigmentadas (44 *M. fortuitum*, 6 *M. chelonei*, 4 *M. smegmatis* e 1 micobactéria com características ainda não descrita e denominada desconhecida). As micobactérias do complexo *M. fortuitum* são bioquimicamente ativas e podem ser diferenciadas das outras de crescimento rápido, geralmente não patogênicas, pela capacidade em crescer no Ágar MacConkey e produzir em 3 dias, reação fortemente positiva para o teste da arilsulfatase (11).

O segundo grupo (Tabela 4) constituído por micobactérias de crescimento rápido e produtoras de pigmento amarelo, reune 19 cepas. Embora preliminarmente classificadas como *M. aurum*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M.*

Tabela 1 - Distribuição das 117 cepas de micobactérias de crescimento rápido (MCR) e de crescimento lento (MCL) isoladas, a partir de 302 amostras de águas, de acordo com a sua procedência.

PROCEDÊNCIA	Águas naturais						Águas tratadas						Águas para criseção						TOTAL GERAL												
	Lago/Rio			Mina			Poço Raso			Sub Total			Torneira			Piscina			Sub Total			Aquário			Piscicult.			Sub Total			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%			
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
MCR	12	10,1	1	0,9	6	5,1	19	16,2	1	0,9	10	8,5	11	9,4	39	33,3	5	4,3	44	37,6	74	63,3	-	-	-	-	-	-	-		
MCL	6	5,1	2	1,7	- ¹	-	8	6,8	1	0,9	27	23,0	28	23,9	2	1,7	5	4,3	7	6,0	43	36,7	-	-	-	-	-	-	-	-	

Tabela 2 - Número e porcentagem das 117 diferentes espécies de micobactérias isoladas, de acordo com a procedência das águas.

Procedência	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonei</i>	<i>M. smegmatis</i>	Quotas MCR		<i>M. catenaforme</i>	<i>M. complexo</i>		Espécies desconhecidas		<i>M. marinum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. avium intracellulare</i>													
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%												
Lago/Rio	7	6,0	-	-	-	-	5	4,3	-	-	2	1,8	4	3,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Poço Raso	2	1,8	-	-	2	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Mina	1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	2	1,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Piscina	1	0,9	5	4,3	1	0,9	2	1,8	17	14,5	-	-	7	6,0	1	0,9	1	0,9	1	0,9	1	0,9	1	0,9	1	0,9
Torneira	-	-	-	-	-	-	1	0,9	1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Aquário	30	25,6	1	0,9	1	0,9	7	6,0	1	0,9	1	0,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Tanque Piscicult.	3	2,6	-	-	-	-	2	1,8	2	1,8	3	2,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TOTAL	44	37,6	6	5,1	4	3,4	19	16,2	22	18,8	8	6,8	11	9,4	1	0,9										

rhodesiae e *M. parafortuitum*, há necessidade de um maior número de testes complementares para confirmar a espécie. Ainda neste grupo foram incluídas 4 cepas com características ainda não descritas. Todas as micobactérias deste segundo grupo não cresceram em ágar MacConkey e forneceram resultados negativos ou fracamente positivos no teste da arilsulfatase, devendo ser consideradas portanto saprófitas do meio ambiente, não necessitando testes bioquímicos adicionais.

O terceiro grupo (Tabela 5) comprehende micobactérias de crescimento lento não pigmentadas (8 do complexo *M. terrae* e 1 do complexo *M. avium intracellulare*).

O último grupo (Tabela 6) comprehende micobactérias de crescimento lento com pigmentação entre amarelo ouro e laranja intenso, é constituído por *M. gordonae*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum* e 11 micobactérias não classificadas. A *M. marinum* está listada juntamente

com as bactérias de crescimento lento, porém pode eventualmente crescer em menos de 5 dias a 30°C.

Entre as micobactérias classificadas como desconhecidas, neste quarto grupo, existem 7 cepas com características morfológicas e bioquímicas semelhantes às de *M. gordonae*, porém com perfil de ácidos micólicos diferentes. Isto mostra a importância da utilização da cromatografia em camada delgada na caracterização de micobactérias. Outras 2 cepas apresentam todas as características bioquímicas do complexo *M. terrae*, inclusive no perfil de ácidos micólicos, porém são escotocromogênicas, ao passo que as últimas são não cromogênicas. Outras duas cepas apresentam características bioquímicas e perfil de ácidos micólicos diferentes das micobactérias de referência.

Os dados ora apresentados mostram que as águas analisadas, quer as naturais como as tratadas ou as

Tabela 3 - Características de micobactérias de crescimento rápido não pigmentadas.

Símbolos: *1 ND - não determinado; *2 TCH₂ - hidrazida do ácido tiofeno 2 dicarboxílico 2ug/ml; *3 TB₁ - tiofenocarbazona 10ug/ml; *4 NH₄OH - hidroxilamina 250ug/ml; *5 EMB - etambutol a 2ug/ml; *6 PNB - ácido p.nitrobenzóico 500ug/ml; *7 CS - cicloserina a 30ug/ml; *8 Capreto - capreomicina a 40ug/ml; *9 PAS - ácido p.aminosalicílico a 2ug/ml; *10 CFA - citrato férrego amoniacial a 15mg/ml.

Características	4 M. fortuitum % (positive)	6 M. chelonei	4 M. smegmatis	1 M. desconhecida
Colônias visíveis	5d	100	100	100
Temperatura crescimento				+
30°C		100	100	100
37°C		100	83,3	100
42°C		23,4	0	50
Capacidade crescimento em LJ contendo				
TCH ₂ *2		100	100	100
TB ₁ *3		100	100	100
NH ₄ OH *4		100	100	100
EMB *5		100	100	75,0
PNB *6		100	100	100
CS *7		100	100	100
Capreto *8		36,9	100	50,0
PAS *9		100	100	100
CFA *10		93,7	100	75,0
NaCl		89,2	ND	50,0
Capacidade crescimento em Agar Nutritivo				
30°C		ND *1	83,3	ND
37°C		100	ND	100
Agar Mac Conkey				
30°C		ND	100	ND
37°C		93,3	ND	0
Utilização de frutose		100	0	100
Provas bioquímicas				
Mescalina		0	13,3	0
Nitrato (2h)		83,3	0	50,0
Urfia (18h)		75,7	83,3	25,0
Arilsulfatase (3d)		90,1	100	0
Catalase				
22°C (>45mm)		66,7	100	50,0
68°C		100	83,3	50,0
Tween 80 (10d)		82,0	83,3	50,0
Penicilinase		12,6	100	25,0
B glicosidase		99,1	0	75,0
Acidos micólicos				
I		100	100	100
II		0,9	100	0
III		0	0	0
IV		0	0	0
V		100	0	100
VI		0	0	0

Tabela 4 - Características de micobactérias de crescimento rápido produtoras de pigmento amarelo.

Símbolos: *1 ND - não determinado; *2 (+) - fracamente positivo.

Característica	10 <i>M.parafont</i>	2 <i>M.aurum</i>	1 <i>M.phlei</i>	1 <i>M.vaccae</i>	1 <i>M.rhodes</i>	4 <i>M.</i>			
	sp	sp	sp	sp	sp	sp	sp	sp	sp
Produção de pigmento									
Luz	100	100	+	+	+	+	+	+	+
Obscuridade	80	100	+	+	+	+	+	+	+
Temperatura crescimento									
30°C	100	100	+	+	+	+	+	+	+
37°C	100	100	+	+	+	+	+	+	+
42°C	50	100	-	-	-	-	-	-	-
Colônias visíveis									
<5d	100	100	+	+	+	+	+	+	+
Crescimento em LJ com									
TCH	100	100	+	+	+	+	+	+	+
TB ₁	100	100	-	+	+	+	+	+	+
NH ₂ OH	30	0	+	-	-	-	+	-	+
EMB	30	0	+	-	-	-	+	-	+
PNB	90	100	+	+	+	+	+	-	+
CS	ND*1	ND	+	ND	-	-	+	-	+
Capreo	40	0	-	+	-	-	-	-	-
PAS	100	100	+	+	+	+	+	+	+
CFA	90	0	+	+	+	+	+	-	-
NaCl	70	100	+	+	-	+	+	-	-
Crescimento em Agar Nutritivo									
37°C	100	100	+	+	+	+	+	~	-
Agar Mac Conkey	0	0	-	-	-	-	-	-	-
Utilização de frutose	90	0	+	+	+	+	+	+	+
Provas bioquímicas									
Niacina	0	0	-	-	-	-	-	-	-
Nitrito	100	100	-	-	-	-	+	-	-
Uréia (18h)	50	100	+	+	-	+	+	-	-
Ariossulfatase (3d)	50(+)*2	0	-	-	(+)	-	-	-	-
Catalase									
22°C>45mm	30	0	-	+	+	-	-	~	-
68°C	90	100	+	+	+	-	+	+	+
Tween 80 (10d)	100	100	+	+	+	+	+	+	+
Penicilinase (5h)	0	100	+	-	+	-	+	ND	-
B glicosidase (3h)	90	50	-	+	-	-	-	-	-
Acidos micálicos									
I	100	100	+	+	+	+	+	+	+
II	100	0	+	+	-	-	-	-	-
III	0	0	-	-	-	-	-	-	-
IV	0	100	+	+	-	-	-	-	-
V	0	0	-	-	-	-	+	+	-
VI	100	100	+	+	+	+	+	+	+

Tabela 5 - Características de micobactérias crescimento lento não pigmentadas.
Símbolos: *1(+): fracamente positiva.

de

Características	8 Complexo <i>M. terrae</i>	1 Complexo <i>M. avium</i> - <i>intrac.</i>
	% positivo	
Temperatura crescimento		
30°C	100	-
37°C *	100	+
42°C	0	-
Colônias visíveis		
<5d	0	-
Crescimento em L3 com		
TCH	100	+
TbI	100	+
NH ₂ OH	100	+
EMB	0	+
CS	100	-
PNB	100	+
Crescimento em		
Agar Nutriente	0	-
Provas bioquímicas		
Niacina	0	-
Nitrito redutase (2h)	0	-
Urease (18h)	0	-
Arlissulfatase (3d)	83,3	
Catalase		
22°C>45mm	83,3	+
68°C	100	+
Tween 80 (10d)	100	-
Penicilinase (5h)	0	NO
8 glicosidase (3h)	100	-
Ácidos micólicos		
I	100	+
II	50(+)*1	-
III	0	-
IV	16,8(+)	+
V	0	0
VI	100	+

Tabela 6 - Características das micobactérias de crescimento lento reprodutoras de pigmento amarelo.

Características	22 <i>M. gordonae</i> % positivo	<i>M. scrofulaceum</i>		<i>M. marinum</i>		11 Micobact. desconh. %	
		4A %	3B %	2C %	2D %		
Produção de pigmento							
Luz	100	+	+	100	100	100	100
Obscuridade	100	+	-	100	100	100	100
Temperatura crescimento							
30°C	100	-	+	100	100	100	100
37°C	100	+	-	100	100	100	100
42°C	0	-	-	0	0	0	0
Crescimento em LJ com							
TCB	100	+	+	100	100	100	100
TB1	100	+	+	100	100	100	100
NH ₂ OH	100	+	-	ND	100	100	100
EMB	0	+	-	ND	0	0	0
PNB	100	+	-	ND	100	100	100
CS	0	ND	ND	0	0	100	0
Crescimento em Agar Nutriente							
30°C<12d	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
37°C<12d	0	-	ND	0	0	0	0
Provas bioquímicas							
Niacina	0	-	-	0	0	0	0
Nitrito redutase (2h)	13,6	-	-	0	0	0	0
Arilssulfatase (3d)	ND	ND	ND	ND	ND	100	100
Catalase							
22°C<45mm	0	+	-	0	0	100	100
68°C	68,2	+	+	100	100	100	100
Tween 80 (5d)	100	-	+	100	100	100	100
B-glicosídeo	ND	ND	ND	ND	ND	100	0
Urease	27,3	+	0	50	0	0	0
Ácidos micólicos							
I	100	+	+	100	100	100	100
II	0	-	-	0	0	0	100
III	100	-	+	100	100	>0	0
IV	100	+	+	100	0	0	0
V	0	-	-	0	0	0	0
VI	0	+	-	100	100	100	0

utilizadas na criação de peixes, albergam micobactérias potencialmente patogênicas, podendo se tornar fonte de contaminação humana. Tal fato, assume grande importância, levando-se em conta que uma maior fração da população humana, está se tornando suscetível à infecção por micobactérias do meio ambiente em decorrência do aumento do número de indivíduos com AIDS e da preservação de pacientes submetidos à cirurgias graves pelo avanço da tecnologia médica.

À medida que os bacilos da tuberculose humana e animal vão sendo eliminados, as micobactérias atípicas difíceis de serem erradicadas dos seus reservatórios, podem tornar-se principal resíduo no problema de infecção por micobactérias.

Summary

Prevalence and distribution of mycobacteria in water of some regions of São Paulo State - Brasil

The occurrence of mycobacteria in water of different regions of São Paulo State was verified in 302 water samples. The sources included natural water (lake, river, and water well), treated water (swimming pool and drinking water), and water in contact with fish (fish tank and aquarium). The water samples were collected from November 1984 to October 1985 and from January through November 1987. One litre of each water sample was filtered using filter membrane (0,45μm). Membranes that filtered more polluted waters (lakes, rivers and fish tanks) were first inoculated in 5ml of Brain Heart Infusion and incubated at 35°C during 6 hours for spore germination. Then, all membranes were treated with a solution of 40% H₂SO₄ during 10 minutes and neutralized with a 30% solution of NaOH. The mixture was centrifuged and the sediment resuspended in 2,0ml of sterilized distilled water. The suspension (0,2ml) of each water samples was inoculated in 4 tubes of Lowenstein-Jensen (L-J) medium and 4 tubes of L-J with 500ug/ml of actidione (Upjohn). The tubes were incubated at 30°C and 37°C

and examined weekly during a 7 weeks period. The identification of the suspected cultures was made using the routine tests (growth on Nutrient Agar; Pigmentation in dark and light; Niacin accumulation; Enzymes activities; Iron uptake; Growth on MacConkey Agar; Growth in presence of: NaCl, Hydroxylamine, Capreomycin, Cicloserine, Ethambutol, p-Aminosalicylate, Thiophen-2 carboxylic acid hidrazide, Thiosemicarbazone and p-Nitrobenzoic acid) with the addition of the analysis of the molicic acids profiles. Water samples from the aquarium contained the greatest abundance of mycobacterium with 88,6% of positive sources and followed by water of well (33,3%); lake and river (29,4%), swimming pool water (28,2%); fish tank (16,6%); spring (12,5%) and drinking water (4,2%). The mycobacteria was absent in all of the artesian wells samples. 63,3% of positive cultures were rapidly growing mycobacteria and the others were slowly growing. 63,7% of cultures were members of *M. fortuitum* presents in varieties of water samples. The others potentially pathogenic mycobacteria were isolated in minor frequency. It was verified that many of the samples analysed were contaminated with potentially pathogenic mycobacteria and other mycobacteria. The most fruitful sources were the water associated with fish and man (aquarium and swimming pool).

Agradecimentos

Este trabalho recebeu suporte financeiro da FAPESP (processos: 86/3231-4, 86/3231-0 e 87/1529-9).

Agradecemos a funcionária Marisa Fernandes pelo auxílio técnico e a Upjohn Produtos Farmacêuticos pela doação do antibiótico Actidione.

Agradecemos a CETESB regional de Araraquara pela orientação, frascos de coleta e auxílio na coleta de amostras de água.

Referências Bibliográficas

- 1.Collins, C.H.; Grange, J.M. & Yaters, M.D. - A review

- Micobacteria in water. *J. Appl. Bacteriol.*, 57:193-211, 1984.
2. Costellat, I.F.; Pestana de Castro, A.F.; Rodrigues, A.C. & Rodrigues, F.M. - Examination of soil in the Campinas rural areas for microrganismis in the *Mycobacterium avium-intracellulare scrofulaceum* complex. *Ust. Vet. J.*, 53:249-350, 1977.
3. Costrini, A.M.; Mahler, D.A.; Gross, N.M.; Hawkins, J.E.; Yerner, R.D. & Esopo, N. - Clinical and roentgenographic features of nosocomial pulmonary disease due to *Mycobacterium xenopi*. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 123:104-109, 1981.
4. Daffe, M.; Lancelle, M.A.; Asselineau, C.; Lévy-Frebault, V. & David, H.L. - Interêt taxonomique des acides gras des mycobactéries: proposition d'une méthode d'analyse. *An. Microbial. (Paris)*:134B:241-256, 1983.
5. Davi, H.; Lévy-Frebault, V. & Papa, F. - Méthodes de Laboratoire pour Mycobacteriologie clinique. Unité de la Tuberculose et des Mycobactéries, Institut Pasteur, France, 1987.
6. Dawson, D.J. & Dennis, F. - Mycobacteria with a growth requirement for ferric ammonium citrate, identified as *Mycobacterium haemophilum*. *J. Clin. Microbiol.*, 11:190-192, 1980.
7. Goslee, S. & Wolinsky, E. - Water as source of potencially pathogenic mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 113:287-292, 1976.
8. Grange, J.M.; Collins, C.H. & Yates, M.D. - Bacteriological survey of tuberculous lymphadenitis in south east England: 1973-1980. *J. Epidemiol. Comm., Health* 36:157-161, 1982.
9. Kazda, J. - The importance of water for the spread of potentially pathogenic mycobacteria. I. Possibilities for the multiplication of mycobacteria. *Zentralbl. Bakteriol. (Orig. B)*: 158:161-169, 1973.
10. Kiehn, T.E.; Edwards, F.F.; Brannon, P.; Tsang, A.Y.; Maio, M.; Gold, J.W.M.; Whimbey, E.; Wong, B.; Mac Clakehy, K.K. & Armstrong, D. - Infection caused by *Mycobacterium avium* complex in immunocompromised patients: diagnosis by blood culture and fecal examination, antimicrobial susceptibility tests, and morphological and soroaglutination characteristics. *J. Clin. Microbiol.*, 21:168-173, 1985.
11. Kubica, G.P. - Differential Identification of Micobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 107:9-21, 1973.
12. Leite, C.Q.F.; Giannini, M.J.S.; Lévy-Frebault, V.; Dayid, H. & Falcão, D.P. - Presence of *Mycobacterium marinum* and other opportunist mycobacteria in swimming pool waters in Araraquara, SP. *Rev. Microbiol.*, 19:354-359, 1988.
13. Lévy-Frebault, V. & David, H.L. - Contaminant du réseau d'eau potable d'un hôpital. *Rev. Epidém. Santé Publ.*, 31:11-20, 1983.
14. Lévy-Frebault, V.; Goh, K.S. & David, H.L. - Molicic acid and analysis for clinical identification of *Mycobacterium avium* and related mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.*, 24:835-869, 1986.
15. Lévy-Frebault, V.; Grandy, J. & David, H.L. - Evaluation of rapid for the identification of mycobacteria. *J. Med. Microbiol.*, 15:575-577, 1982.
16. Meyer, L. & David, H.L. - Evaluation de l'activité uréase et de l'activité - glucosidase pour l'identification pratique de mycobactéries. *Ann. Microbiol. (Paris)*, 130B:323-332, 1979.
17. Du Moulin, G. & Stattmeier, K.D. - Waterborne Micobacteria: An increasing threat to health. *ASM News* 52:525-529, 1986.
18. Park, W.K. & Brewer, N.S. - The recovery of *Mycobacterium marinum* from swimming pool water and its resistance to chlorine. *J. Environ. Healt*, 38:390-392, 1976.
19. Wolinsk, E. - Nontuberculous Mycobacteria and associated diseases. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 119:107-158, 1979.

Recebido para publicação em 15/05/89

EMPREGO DO MÉTODO DE CO-AGLUTINAÇÃO NA DETECÇÃO DE ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL (LT) DE *ESCHERICHIA COLI*

Roberto Mitio Yanaguita
 Antonio Desidério Barbosa
 Luzinete Alves Silva

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

& Alfredo Elias Gilio

Universidade de São Paulo
 Hospital Universitário
 Av. Prof. Lineu Prestes,
 05508 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Das fezes diarréicas de 100 crianças (com idade entre zero a dois anos) internadas na Pediatria do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo foram isoladas 100 amostras de *Escherichia coli*. Estas foram analisadas quanto à produção de enterotoxina LT empregando-se o método originalmente desenvolvido por Ronnberg & Wadstrom (1983), com ligeira modificação que consistiu na coloração da suspensão estafilocócica pelo corante Ponceau S. Como resultado obteve-se 7 amostras (7%) que deram reação positiva. A coloração facilitou a leitura quando comparada com suspensão não corada. A metodologia empregada poderá realizar a detecção de amostras enterotoxigênicas em curto espaço de tempo, isto é, 24 horas para cultivo de *E. coli* e mais uma hora e quarenta minutos para extração da enterotoxina LT.

Introdução

Entre as causas mais importantes de morbidade e mortalidade infantil estão as diarréias determinadas por várias etiologias e, em muitos casos, o responsável era detectado somente em cerca de 20% (15).

A relação etiológica entre *Escherichia coli* e doença diarréica em crianças foi estabelecida a partir da década de 40 mas, as pesquisas só foram intensificadas a partir de 1960, quando descreveram-se vários grupos de *E. coli*, entre os quais, as ETEC (*E. coli* enterotoxigênicas) que produzem duas classes de enterotoxinas citotóxicas conhecidas por ST (termoestável) e LT (termolábil) (13).

A relação das enterotoxinas ST e LT é realizada por ensaios biológicos, imunológicos e co-aglutinação com células de *Staphylococcus aureus* (1, 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12).

Material e Métodos

1. Amostras de *Escherichia coli*

As culturas de *E. coli* foram isoladas de fezes diarréicas de 100 crianças (entre 0 a 2 anos de idade) internadas no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo, Bairro Butantã, São Paulo, durante o ano de 1988. O isolamento foi efetuado no meio de Mac Conkey (Difco) e

caracterizadas presuntivamente no meio IAL (10), com confirmação bioquímica segundo Edwards & Ewing (6).

2. Preparo da suspensão de *Staphylococcus aureus* (Kronvall (9))

A cultura de *Staphylococcus aureus* cepa Cowan 1 foi cultivada em 100ml do meio BHI (Difco) e incubada a 37°C durante 18 a 24 horas sob agitação. Passado esse tempo, a cultura foi centrifugada a 2.000g por 30 minutos e lavadas duas vezes com tampão fosfato (PBS). O material foi novamente centrifugado e o sedimento suspenso em 10ml de PBS ao qual foram adicionados formaldeído na proporção de 0,5%, sendo deixado em repouso por 3 horas à temperatura ambiente. Novamente centrifugou-se e lavou-se por duas vezes. O sedimento foi aquecido a 80°C em banho-maria durante 10 minutos e posteriormente submetido a teste de esterilidade. O sedimento foi suspenso em 1ml de PBS ao qual adicionou-se 0,1ml de antissoro CT (antitoxina do *Vibrio cholerae*) para sensibilização durante uma hora em temperatura ambiente. Decorrido o tempo adicionou-se 0,1ml de solução de Ponceau S para corar as células. Ajustou-se o volume final para 10ml. A suspensão mantinha-se estável durante 4 semanas.

3. Extração da enterotoxina LT (Ronnberg & Wadstrom (12))

As amostras de *E. coli* foram cultivadas em placas com ágar-sangue (Columbia agar base, Difco, com 7% de sangue desfibrionado de carneiro) durante 24 horas a 37 °C. De cada amostra eram removidas 4 colônias com o auxílio de uma alça de platina e adicionadas em 0,1ml de solução de Polimixina B (2mg/ml). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 37°C durante 1 hora, quando foi adicionada 0,001ml de solução a 1% de Triton X 100. Passados 10 minutos procedeu-se à centrifugação a 2.000g durante 30 minutos. O sobrenadante de cada amostra foi separada para a pesquisa da enterotoxina LT.

4. Técnica da co-aglutinação (Ronnberg & Wadstrom (12))

Uma gota do sobrenadante obtida da

amostra lisada foi colocada sobre uma lâmina de vidro e ao lado desta, uma gota da suspensão de *Staphylococcus aureus* sensibilizada. As gotas foram misturadas com um palito de plástico e depois com movimento circular por um período de 2 a 5 minutos, quando era feita a leitura, tendo-se o cuidado de comparar sempre com o controle, tanto positivo (lisado de *E. coli* 2121/81 do Instituto Adolfo Lutz) e negativo (lisado de *E. coli* 0111, ICB/USP). Foram consideradas positivas amostras que apresentaram o mesmo grau de aglutinação observada com o controle.

Resultado e Discussão

Obteve-se 7 amostras (7%) que deram co-aglutinação positiva entre as 100 examinadas. A coloração das células de *Staphylococcus aureus* pelo corante Ponceau S facilitou a leitura.

A sensibilização da suspensão estafilocócica foi realizada com antissoro CT pela dificuldade encontrada na obtenção do antissoro LT. Considerando-se que a toxina colérica apresenta propriedades biológicas semelhantes à enterotoxina LT, bem como a presença de determinantes antigênicos comuns, a utilização de antissoro CT permitirá a obtenção de resultado similar (3).

Segundo Ronnberg & Wadstrom (12), quando se utiliza células estafilococicas sensibilizadas com antissoro CT, a aglutinação só será observada quando as células de *E. coli* lisadas liberarem no sobrenadante quantidades de 10ng ou mais de toxina LT mas, se a sensibilização for realizada com antissoro LT, a aglutinação ocorrerá com cerca de 5ng, demonstrando haver maior especificidade da reação com o antissoro homólogo.

A grande vantagem desta técnica, uma vez preparada a suspensão estafilocócica, que se mantém estável por 4 semanas, é sem dúvida, a obtenção de resultado bastante precoce, quanto à revelação de amostras de *E. coli* enterotoxigênicas, pois são necessárias 24 horas para cultivar a amostra em ágar-sangue, e mais o tempo para a extração da enterotoxina que não demanda mais do que uma hora e quarenta minutos. Além

do mais, a sensibilidade da técnica já foi comparada com aquelas que empregam culturas celulares Y1 e Cho (12, 14) demonstrando haver plena compatibilidade com as mesmas.

Summary

Use of co-agglutination test for detection of enterotoxin LT from Escherichia coli

It was isolated 100 samples of *Escherichia coli* from feaces of 100 children (up to 2 years old) presenting diarrhea at the "Hospital Universitário" from "Universidade de São Paulo". The samples were analysed for production of LT enterotoxin by the method originally described by Ronnberg & Wadstrom (1983). A slight modification was introduced, concerning the staining of the suspension by Ponceau S dye. The results showed 7 samples (7%) with reaction. Staining of suspension made detection of agglutination easier, when compared to unstained samples. This method might be useful for quick detection of enterotoxicigenic samples: 24 hours for growing *Escherichia coli* strains and 1:40hs for extraction of LT enterotoxin.

Agradecimento

Os autores agradecem à Profa. Dra. Beatriz E. C. Guth pelo fornecimento do antissoro CT.

Referências Bibliográficas

1. Bettelheim, K.A.; Gracey, M. & Wadstrom, T. - The use of coagglutination test to determine whether Australian and New Zealand isolates of *Escherichia coli* produce the heat-labile enterotoxin. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A*, 260:293-299, 1985.
2. Brill, B.M.; Wasiluska, B.L. & Richardson, S.H. - Adaptation of the Staphylococcal coagglutination technique for detection of heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*. *J. Clin.*

- Microbiol.
3. Clements, J.D. & Finkelstein, R.A. - Immunological cross reactivity between a heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* and subunits of *Vibrio cholerae* enterotoxin. *Infect. Immun.*, 21:1036-1039, 1978.
4. Dean, A.G.; Ching, Y.; Williams, R.G. & Harden, L.B. - Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice:application in a study of diarrhoea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.*, 125:407-411, 1972.
5. Donta, S.T.; Moon, H.W. & Whipp, S.C. - Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue culture. *Science*, 183:334-335, 1974.
6. Edwards, P.R. & Ewing, W.H. - Identification of Enterobacteriaceae. 3rd. ed. Minneapolis, Burgess Publishing Co, 1972.
7. Evans, D.J. & Evans, D.G. - Direct serological assay for the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* using passive immune hemolysis. *Infect. Immun.*, 16:604-609, 1977.
8. Honda, T.; Taga, S.; Takeda, Y.; Miwatani, T. - Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxicigenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 13:1-5, 1981.
9. Kronvall, G. - A rapid slide-agglutination method for typing pneumococci by means of specific antibody adsorbed to protein A containing staphylococci. *J. Med. Microbiol.*, 6:187-190, 1973.
10. Pessoa, G.V.A. & Silva, E.A.M. - Meios de Rugai e Lisina-motilidade combinados em um só tubo para identificação presuntiva de enterobactérias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 32:97-100, 1972.
11. Ricci, L.C.; Serafim, M.B.; Siqueira, P.S. & Pestana de Castro, A.F. - Uso de eritrócitos de diferentes origens em testes sorológicos para a detecção da enterotoxina termolábil (LT) de *Escherichia coli*, de origem humana e suína. *Rev. Microbiol. São Paulo*, 19:217-222, 1988.
12. Ronnberg, B. & Wadstrom, T. - Rapid detection by a coagglutination test

- of heat-labile enterotoxin in cell lysates from blood agar-grown *Escherichia coli*. J. Clin. Microbiol., 17:1021-1025, 1983.
13. Sack, R.B. - Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. Ann. Rev. Microbiol., 29:33-353, 1975.
14. Steinruck, H.; Samtueben, S.; Ronnberg, B. & Wadstrom, T. - Comparison of a coagglutination test with the GM1 - Elisa and Y1 adrenal cell assay for the detection of heat-labile enterotoxin from *Escherichia coli*. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A, 260:436-442, 1985.
15. World Health Organization. Scientific Working Group on Epidemiology and Etiology *Escherichia coli* diarrhoea. Bull. WHO, 58:23-36, 1980.

Recebido para publicação em 22/6/89

EMPREGO DO TESTE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA NO DIAGNÓSTICO DA PESTE (INFECÇÃO PELA YERSINIA PESTIS) NOS FOCOS DO NORDESTE DO BRASIL

Maria Edileuza Felinto de Brito
 Darcí Pascoal Brasil
 Célio Rodrigues de Almeida
 & Alzira Maria Paiva de Almeida

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
 Caixa Postal 7472
 Cidade Universitária
 50730 Recife PE, Brasil

Resumo

Para avaliar a importância do emprego do teste de IMF na metodologia das atividades de vigilância e controle da peste nos focos brasileiros, foram realizados estudos com 10 macerados de "pools" de pulgas infectadas experimentalmente pela *Yersinia pestis*, 10 amostras de macerados de baços de roedores naturalmente infectados e 59 amostras de suco bubonático de pacientes, obtidas durante um surto de peste no Estado da Paraíba, em 1986. Os resultados das análises mostraram que o teste de IMF é inadequado para a detecção da *Y. pestis* em máceradores, entretanto apresenta interesse no diagnóstico da peste em material humano e de roedores, particularmente no caso de amostras contaminadas ou quando as bactérias tenham perdido a viabilidade.

Introdução

As atividades de vigilância e controle da peste nos focos do Brasil, envolvem a captura sistemática e exames bacteriológicos dos roedores e seus ectoparasitos, para detecção da *Yersinia pestis* e a pesquisa de anticorpos antipestosos, através de inquéritos sorológicos entre roedores e carnívoros domésticos ou silvestres (5, 7).

Apesar do encontro frequente de roedores carnívoros domésticos (cães e gatos) oriundos de todas as regiões que constituem focos de peste nacionais, com anticorpos contra a *Y. pestis* (1, 2, 3, 5, 6, 7), os isolamentos do bacilo têm sido escassos, mesmo durante surtos de peste humana (4, 6, 7, 14).

Em vista da focalização da peste na zona rural (13), a maioria das ocorrências é registrada em locais muito distantes dos centros de diagnóstico, as amostras obtidas para exames são transportadas de diversas

maneiras e só chegam nos laboratórios onde são analisadas, várias semanas depois da coleta (19). Algumas vezes os processos empregados na conservação das amostras, não são adequados, acarretando a morte da bactéria.

Almeida & cols. (4) e Brasil & cols. (14) obtiveram baixa positividade nas amostras de material de roedores e pulicídeos conservados de várias maneiras para transporte e análise bacteriológica.

Embora o teste de Imunofluorescência seja considerado de grande interesse na identificação do bacilo da peste, particularmente em carcaças mumificadas ou putrefeitas de roedores, inclusive longo tempo após o bacilo ter perdido a viabilidade (16, 20), até o momento não foi adotado na metodologia das atividades de diagnóstico de peste no nosso País, principalmente pelo fato do conjugado não ser produzido comercialmente.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia do teste de imunofluorescência direta (IMF) com

anticorpos específicos contra a fração antigênica, F1A da *Yersinia pestis*, em material proveniente de regiões dos focos de peste no Brasil.

Material e Métodos

Antígenos - Fração antigênica específica (F1A) da *Yersinia pestis*, extraída da cepa de peste A1122, segundo Baker & cols. (11). Cepa de peste P.PB 862, isolada de um paciente do Estado da Paraíba, em 1986 (6), uma cepa de *Yersinia pseudotuberculosis* e uma cepa de *Yersinia enterocolitica* (coleção do Instituto Pasteur de Paris).

Antissoro - Produzido em coelhos, por inoculação intramuscular de suspensão de F1A em Adjuvante Incompleto de Freund (Difco).

Conjugado - Preparado por precipitação das globulinas de antissoro de coelho, com solução de Sulfato de Amônio (40%) e marcação com Isotiocianato de Fluoresceina (FITC/Sigma) seguindo o protocolo do "Plague Branch, Center for Disease Control (CDC), Fort Collins, Co, USA". Foi determinada a "Routine Test Dilution" (RTD) por diluições do conjugado em soro normal e soro imune de coelhos (anti-F1A) e testes com esfregaços de baços de camundongos albinos, "Swiss-Webster", inoculados com a cepa P.PB 862. Uma parte do conjugado obtido, foi diluído na "RTD" em soro normal de coelho, para o teste de imunofluorescência (IMF+) e o restante em antissoro de coelho, imunizado com F1A, para o teste de inibição da fluorescência (IMF-), (16).

Teste de imunofluorescência direta (IMF) - Foram preparados esfregaços em duplicata de cada material, sendo um para o teste de fluorescência (IMF+) e outro para o teste de inibição da fluorescência (IMF-). Os esfregaços foram deixados secar naturalmente, fixados por ligeiro aquecimento, colocados os respectivos conjugados (IMF+ e IMF-) e incubados durante 30 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente. Após dois banhos por imersão durante 10 minutos em salina tamponada 0,1M (PBS) pH 7,2, as lâminas foram

secas e as lâminulas montadas com glicerol pH 9,5, para observação no microscópio de fluorescência.

Material analisado - 10 "pools" de pulicídeos (5 pulgas por "pool") infectados experimentalmente no laboratório com *Yersinia pestis*, macerados em salina e semeados no meio de conservação e transporte de Cary-Blair em novembro de 1987 e mantidos desde então em temperatura ambiente (14). 10 macerados de baços de roedores naturalmente infectados pela *Y. pestis*, obtidos durante um surto de peste no Estado da Paraíba em 1986, conservados no meio de Cary-Blair a 4°C (6). 59 amostras de suco bubonático obtidas de pacientes com diagnóstico clínico de peste (7, 15) durante o surto no Estado da Paraíba em 1986 (6) e conservadas no meio de Cary-Blair a 4°C.

Como controles foram utilizados esfregaços de baços de camundongos recentemente mortos por infecção pela *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* e *Y. enterocolitica*.

Testes sorológicos - Hemaglutinação e inibição da hemaglutinação segundo recomendações do Comitê de Peritos em Peste da OMS (22).

Provas bacteriológicas - Os cultivos para isolamento e identificação da *Y. pestis* foram realizados em Base de Ágar Sangue (BAB/Difco) e Caldo Infuso de Cérebro e Coração (BHI), seguindo a metodologia descrita por Baltazard & cols. (12), Bahmanyar & Cavanaugh (10) e Karimi (18).

Inoculações - Camundongos albinos, "Swiss-Webster", foram inoculados pela via subcutânea, com 0,5ml das suspensões dos macerados de pulgas e suco bubonático dos pacientes, mantidos no meio de Cary & Blair (2 camundongos por amostra) e processados conforme descrito por Almeida & cols. (8). Os macerados de vísceras dos roedores foram inoculados pela via percutânea no dorso de cobaias segundo recomendações de Karimi (18).

Resultados e Discussão

Os resultados das análises

realizadas com os macerados dos "pools" de pulicídeos infectados experimentalmente pela *Y. pestis*, triturados de vísceras de roedores naturalmente infectados e suco bubonático dos pacientes clinicamente suspeitos de peste, obtidos durante um surto no Estado da Paraíba em 1986 e conservados durante vários meses no meio de Cary & Blair, encontram-se na Tabela 1.

A *Y. pestis* foi encontrada em todos os macerados de pulicídeos, por cultivo em BAB, embora o crescimento tenha sido escasso (menos de 100 colônias por placa). Todos os testes de IMF realizados com essas amostras foram negativos, apesar de repetidos várias vezes, entretanto esfregaços das colônias desenvolvidas no BAB, foram positivas por IMF.

Segundo Cavanaugh & Handall (15), no organismo do vetor invertebrado, com temperatura inferior à 37°C, a *Y. pestis* não sintetiza o antígeno F1A, portanto o teste de IMF com anticorpos específicos contra esse antígeno, seria inadequado para a detecção do bacilo da peste nas pulgas.

Por outro lado, Hudson & cols. (17) obtiveram resultados de IMF negativos nos exames de macerados de pulgas recentemente infectadas no laboratório pela *Y. pestis*, mas observaram que, se os macerados eram semeados em caldo e incubados durante 24h à 48h a 37 °C, resultavam positivos nos testes de IMF.

Esse processo de enriquecimento, entretanto, só é exequível em condições experimentais, tornando-se impraticável nos trabalhos de campo, uma vez que segundo observações de Brasil & cols. (14) frequentemente as amostras de pulgas recebidas para exames apresentam-se fortemente contaminadas.

Apenas 2 macerados de pulgas revelaram-se positivos pelas inoculações: os camundongos inoculados com essas amostras, morreram de peste, confirmada por cultura e/ou IMF positivos, ou apresentaram título significativo de anticorpos contra a F1A de *Y. pestis*, pelo teste de hemaglutinação (22). Esses camundongos são altamente resistentes à *Y. pestis* e apresentam DL50 superior a 1000 bacilos com as

Tabela 1 - Resultados das análises realizadas para detecção da *Yersinia pestis* em material de origem humana, de roedores e de pulicídeos conservados no meio de Cary & Blair.

Símbolos: a - soroconversão nos camundongos inoculados; b - reação característica na pele dos cobaios; c - soroconversão ou cultura e/ou IMF positivos dos camundongos inoculados.

Origem	Número de amostras analisadas (positivas)		
	IMF	cultivo	inoculações
Homem	59 (4)	59 (2)	4 (3) ^a
Roedores	10 (9)	10 (4)	10 (1) ^b
Pulicídeos	10 (0)	10 (10)	10 (2) ^c

cepas isoladas nos focos de peste no Nordeste do Brasil, entretanto são capazes de produzir anticorpos específicos contra o antígeno F1A da *Y. pestis*, mesmo quando inoculados com pequeno número de bacilos (9).

No caso das amostras utilizadas no presente trabalho, é provável que os resultados negativos nos testes de IMF e das inoculações, sejam devidos ao pequeno número de bactérias existentes nessas amostras.

Das 59 amostras de suco bubonático colhidas dos pacientes durante o surto de peste no Estado da Paraíba (6) e que se encontravam conservadas no meio de Cary & Blair a 4°C a partir de outubro de 1986, 4 foram positivas por IMF. Destas quatro, 2 desenvolveram crescimento de *Y. pestis* ao serem originalmente examinadas e quando re-examinadas cerca de 30 meses mais tarde. Uma dessas amostras havia sido coletada em um paciente sorologicamente positivo pelo teste de hemaglutinação para anticorpos contra a F1A da *Y. pestis* e a outra de paciente negativo para esse teste. A cultura isolada do paciente era produtora de F1A (6) e os camundongos inoculados com o material original conservado no meio de Cary & Blair, fizeram soroconversão. A falta de resposta sorológica do paciente deve estar relacionada à alguma causa individual e não à falta de F1A na bactéria (7, 20). Das duas outras amostras positivas por IMF, nenhum crescimento bacteriano foi observado

nas duas ocasiões em que foram cultivadas, embora tenham sido obtidas de pacientes positivos pelo teste de hemaglutinação. Como além do teste de IMF positivo, os camundongos inoculados fizeram soroconversão, é possível admitir a presença de bactérias inviáveis nessas amostras. Os camundongos inoculados com uma das amostras positivas por cultura e IMF, morreram precocemente, provavelmente por toxemia e as culturas e testes de IMF foram negativos.

Quanto às 55 amostras negativas pelo teste de IMF, 5 haviam sido colhidas de pacientes sorologicamente positivos e as demais de pacientes negativos pelos testes sorológicos. Os cultivos realizados com 43 destas amostras não produziram nenhum crescimento bacteriano quando originalmente examinadas e 12 apresentavam crescimento de contaminantes. Quando re-examinadas, os cultivos dessas amostras também foram negativos.

Em relação aos 10 macerados de vísceras de roedores naturalmente infectados pela *Y. pestis* e conservados no meio de Cary-Blair durante 32 meses à 4°C, 9 amostras foram positivas por IMF e apenas 4 produziram crescimento de *Y. pestis* no BAB, sendo 3 culturas puras e 1 com predominância de contaminação. As 5 amostras negativas, apresentavam crescimento abundante de contaminantes que podem ter sobrepujado o crescimento da *Y. pestis*.

O material dos roedores foi inoculado pela via percutânea no dorso de cobaias, procedimento recomendado por Karimi (18), no caso de material contaminado. Apenas 1 amostra cuja cultura havia sido positiva, para a *Y. pestis* provocou reação característica na pele do animal.

Apesar do registro de reações falso positivas pelo teste de IMF (21), os camundongos inoculados com *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis* foram negativos nas condições em que os testes foram realizados. O teste de inibição da fluorescência (16) aumenta a especificidade dos resultados.

Comparando os resultados das análises realizadas com material de origem humana, de pulgas e de roedores, verifica-se que para a detecção da peste em maceradores de pulgas, o processo mais adequado é o

cultivo no meio de BAB sendo o teste de IMF inadequado.

Em relação ao material de origem humana e de roedores, o teste de IMF mostrou-se mais eficaz do que os cultivos e as inoculações.

Embora conferindo um diagnóstico apenas presuntivo da infecção e não o diagnóstico de certeza que é o isolamento do bacilo, o teste de IMF poderá ser de grande importância no diagnóstico da peste humana e de roedores e outros mamíferos principalmente nos casos em que os processos utilizados no transporte das amostras para exames tenham inviabilizado o isolamento de *Y. pestis*.

Summary

Use of immunofluorescent antibody test in the plague diagnosis in the foci of the Brazil

The usefulness of the fluorescent antibody test to F1A antigen of *Y. pestis*, in the activities of surveillance and control of plague in Brazil, was evaluated. Studies were carried out on macerates of 10 pools of fleas experimentally infected with *Y. pestis*, 10 samples of material from naturally infected rodents and 59 bubo aspirates from clinically suspected patients, collected during a plague outbreak, in the Paraiba State, in 1986. The results obtained show that the IMF test is useless to *Y. pestis* detection on the fleas triturates, while is valuable for the diagnosis of human and rodent plague, particularly when the samples are heavily contaminated or when the bacteria has lost its viability.

Agradecimentos

Agradecemos a Roberto Pereira Werkhauser, Janaína Campos de Miranda, Nilma Cintra Leal, José Dantas Sobrinho e Yara Maria Maia Nakazawa, pelo apoio e ajuda técnica no presente trabalho.

Referências Biliográficas

1. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Silva, N.T.C. & Almeida, C.R. -

- Informe sobre a peste bubônica (infecção por *Yersinia pestis*) no Estado de Minas Gerais, Brasil. Rev. Microbiol. (São Paulo), 15:145-146, 1984.
2. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B.; Leal, N.C. & Almeida, C.R. - Detecção da peste no Estado da Bahia. Rev. Microbiol. (São Paulo), 16:232-233, 1985.
3. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B.; Nakasawa, M. & Almeida, C.R. - Demonstração de atividade pestosa no foco da Serra dos Órgãos (Rio de Janeiro, Brasil) no período de 1983 a 1984, através de exames sorológicos em roedores. Rev. Microbiol. (São Paulo), 16:280-281, 1985.
4. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Carvalho, F.G. & Almeida, C.R. - Pesquisa de *Yersinia pestis* em roedores e outros pequenos mamíferos nos focos pestosos do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. Rev. Saúde Pública, (São Paulo), 21:265-267, 1987.
5. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Melo, M.E.S.; Leal, N.C. & Almeida, C.R. - Importância dos carnívoros domésticos (cães e gatos) na epidemiologia da peste nos focos do Nordeste do Brasil. Cad. Saúde Pública (RJ), 1:49-55, 1988.
6. Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Leal, N.C.; Melo, M.E.B. & Almeida, C.R. - Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado da Paraíba, Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 84:249-256, 1989.
7. Almeida, C.R.; Almeida, A.M.P.; Vieira, J.B.; Guida, U. & Butler, T. - Plague in Brazil during two years of bacteriological and serological surveillance. Bull. WHO., 59:591-597, 1981.
8. Almeida, C.R.; Almeida, A.M.P.; Brasil, D.P.; Dantas Sobrinho, J. & Leal, M.A. - Estudo do roedor *Akodon arvicoloides*, Wagner, 1842 (Cricetidae). Importância nos focos pestosos do Brasil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 81:407-414, 1986.
9. Almeida, C.R.; Brasil, D.P.; Melo, M.E.B.; Leal, N.C. & Almeida, A.M.P. - Resistência de camundongos a infecção experimental pela *Yersinia pestis*. XXV Congresso Soc. Bras. Med. Trop., 185, 1989.
10. Bahamanyar, M. & Cavanaugh, D.C. - Plague Manual. WHO, Geneve, 1976.
11. Baker, E.; Sommer, H.; Foster, L.E.; Meyer, E. & Meyer, K.F. - Studies on the immunization against plague I. The isolation and characterization of the soluble antigen of *Pasteurella pestis*. J. Immunol., 68:131-145, 1952.
12. Baltazard, M.; Davis, D.H.S.; Davignat, R.; Girard, D.; Gohar, M.A.; Kartman, L.; Meyer, K.F.; Parker, M.T.; Pollitzer, R.; Prince, F.M.; Quan, S.F. & Wagle, P. - Recommended laboratory methods for the diagnosis of plague. Bull. WHO., 14:457-509, 1956.
13. Baltazard, M. - Viagem de estudos ao Brasil para a organização de um projeto de pesquisa sobre a peste. Rev. Bras. Malariol. D. Trop., 20:335-366, 1968.
14. Brasil, D.P.; Carvalho, F.G.; Almeida, C.R. & Almeida, A.M.P. - Pesquisa de *Yersinia pestis* em pulicídeos nos focos pestosos do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. (Em publicação).
15. Cavanaugh, D.C. & Randall, R. - The role of multiplication of *Pasteurella pestis* in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea borne plague. J. Immunol., 83:348-363, 1959.
16. Hudson, B.W.; Quan, S.F. & Kartman, L. - Efficacy of fluorescent antibody methods for detection of *Pasteurella pestis* in carcasses of albino laboratory mice stored for various periods. J. Hyg., Camb., 60:443-451, 1962.
17. Hudson, B.W.; Kartman, L. & Prince, F.M. - *Pasteurella pestis* detection in fleas by fluorescent antibody staining. Bull. WHO., 34:709-714, 1966.
18. Karimi, Y. - Diagnostique rapide de l'infection pesteuse au laboratoire. Bull. Soc. Path. Exot., 1:45-48, 1978.
19. Mello, M.T.; Paracampo, H. & Santos, D.A. - Emprego do meio de Cary & Blair para conservação e transporte de material suspeito de peste em zonas rurais. Rev. Bras. Malariol. D. Trop., 21:767-773, 1969.
20. Poland, J.O. & Barnes, A. - Plague. In: Steele, J.H. CRC Handbook Series in Zoonoses. Section A:

- Bacterial, Rickettsial and Mycotic Diseases. Boca Raton, CRC Press, 515-558, 1979.
21. Quan, S.F.; Knapp, W.; Goldenberg, M.I.; Hudson, B.W.; Lawton, W.D.; Chen, T.H. & Kartman, L. - Isolation of a strain of *Pasteurella pseudotuberculosis* from Alaska identified as *Pasteurella pestis* an immunofluorescent false positive. Amer. J. Trop. Med., 14:124-132, 1965.
22. Who Expert Committee on Plague. WHO. Technical Report Series. Fourth Report, 447:23-25, 1970.

Recebido para publicação em 19/09/89

LIBERAÇÃO DAS FOSFATASES ÁCIDA E ALCALINA REPRESSÍVEIS DE *NEUROSPORA CRASSA*

POR

Ely Nahas
 Luiz Carlos de Assis
 & José Carlos Zanon

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

Resumo

O efeito de diversos compostos químicos sobre a liberação das fosfatases ácida e alcalina repressíveis de *Neurospora crassa* foi estudado. A fosfatase ácida teve sua atividade estimulada quando adicionaram ao meio de cultura Tween 80, Tween 20 e dodecilsulfato de sódio (SDS) enquanto que a atividade da fosfatase alcalina foi favorecida por Tween 80, Tween 20, SDS, desoxicólico de sódio, NaCl e KCl. Além do efeito sobre a liberação das enzimas, os detergentes não iônicos, Tween 80, Tween 20 e Triton X-100, adicionados à mistura de reação, estimularam a atividade da fosfatase ácida enquanto que os iônicos, taurocolato de sódio e SDS, a inibiram. Esse efeito não foi observado com a fosfatase alcalina. Concentrações crescentes de Tween 80 aumentaram a secreção da fosfatase ácida e de proteína. A liberação da fosfatase ácida foi dependente do tempo, culminando a atividade da enzima após 3 horas da adição do Tween 80.

Introdução

Foi demonstrado que a produção e secreção das fosfatases repressíveis está na dependência do tipo e concentração da fonte de carbono adicionada ao meio de cultivo de *N. crassa* (15). No decurso deste trabalho foi igualmente verificado que a atividade da fosfatase ácida repressível secretada no meio de cultura, pelo menos duplicava quando sacarose era substituída por Tween 80 como fonte de carbono (dados não publicados). Da mesma forma, a secreção de enzimas tem sido estimulada quando sacarose monopalmitato foi utilizado como fonte de carbono de fungos e leveduras (21). Compostos como Tween 80 e outros detergentes, solvente orgânicos e outros reagentes têm sido assinalados na literatura como solubilizadores de proteínas de membrana (6). Desta maneira, a utilização de detergentes

estimulou a atividade enzimática da sintetase de glucano em preparações particuladas de *Paracoccidioides brasiliensis* (22) ou da fosfatase alcalina em *Cuscuta reflexa* (11). Por outro lado, a proteinase de *Mucor hiemalis*, que se encontra ligada à superfície micelial, foi liberada quando se adicionaram cloreto de sódio ou outros sais ionizáveis no meio de cultura (25). Igualmente, a proteinase de *Microccus freudenreichii* foi liberada por cloreto de sódio (12).

É inegável que inúmeras substâncias químicas apresentam um papel importante sobre a produção ou secreção de enzimas microbianas ou vegetais. No entanto, o papel fisiológico que essas substâncias exercem sobre as fosfatases repressíveis em culturas de *N. crassa* não tem sido devidamente esclarecido. Portanto, este trabalho tem por objetivo estudar o efeito que detergentes e sais iônicos adicionados

ao meio de cultura ou à mistura de reação apresentam sobre a atividade das fosfatases repressíveis, ácida e alcalina, neste fungo.

Material e Métodos

Microrganismo - Foi utilizada a linhagem selvagem de *Neurospora crassa* St.L. 74A.

Meios de cultura e condições dos cultivos - em tubo de ensaio, foi utilizado o meio de Vogel (24), suplementado com 1,5 (p/v) de sacarose e 1,5 (p/v) de ágar. Em placa de Petri de 14cm de diâmetro, utilizou-se 50ml do meio de Crocken & NYC (14) contendo 1,5 (p/v) de sacarose ou 0,5% (v/v) de Tween 80, como fonte de carbono, e fosfato 50 μ M. O pH foi ajustado para 5,6 quando se objetivou a secreção da fosfatase ácida e para 7,5 quando se objetivou a secreção da fosfatase alcalina. Neste caso, o meio de cultura foi tamponado com Tris. HCl 50mM (16).

Para a obtenção do inóculo, conídios foram suspensos em água destilada e esterilizada e filtrados para remover micélio. Um volume de 0,5ml da suspensão ajustada para 1×10^8 conídios/ml foi inoculado por placa. A incubação das culturas foi feita à 30°C. Após o período de crescimento, as culturas foram filtradas para separar o micélio e obtenção do meio de cultura isento de células para determinação da atividade enzimática. O peso seco foi determinado por secagem da massa micelial a 98°C por 24h.

Tratamento do fungo com agentes de membrana - As culturas do fungo com 72h de crescimento adicionaram-se, sob agitação e assépticamente, os compostos relacionados na Tabela 2. Após o período de incubação, as culturas foram filtradas como acima e a atividade enzimática determinada no filtrado. Quando se pretendeu estudar o efeito da concentração e do tempo de incubação do Tween 80 sobre a secreção das fosfatases, utilizaram-se culturas com 48h de crescimento.

Atividade enzimática - A atividade da fosfatase ácida repressível foi determinada pela incubação de uma

mistura contendo p-nitrofenilfosfato 6mM em tampão acetato 0,1M pH 5,4 e a enzima, num volume total de 2,0ml, à temperatura de 37°C (18). Após um tempo apropriado, a reação foi detida pela adição de 1ml NaOH 1M e o p-nitrofenol formado foi determinado pela sua absorbância em 405nm ($\epsilon = 17800 \text{ mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$). A atividade da fosfatase alcalina repressível foi determinada da mesma forma, apenas que o tampão acetato foi substituído por tampão glicina 0,3M pH 9,0, contendo EDTA 1mM (19). Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a liberação de 1 μ mol de p-nitrofenol por hora. A atividade específica foi expressa em unidades por mg de micélio seco.

Quando se procurou verificar o efeito dos agentes de membrana sobre a atividade enzimática, a mistura de reação foi preparada como descrito acima, porém acrescida do composto conforme relação da Tabela 3, num volume total de 2,0ml.

Proteína foi determinada pelo método de Lowry (5), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

Análise estatística - Utilizou-se experimento inteiramente casualizado sendo que as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. O coeficiente de correlação foi testado pelo teste t.

Resultados

A atividade da fosfatase ácida repressível em meio de cultura tendo Tween 80 como fonte de carbono foi pelo menos 4 vezes superior à atividade encontrada em meio de cultura contendo sacarose (Tabela 1). Como a secreção da fosfatase alcalina repressível está sujeita a um controle pelo pH (16), utilizou-se meio de cultura tamponado com Tris. HCl 50mM em pH 7,5. Nessas condições, a atividade no meio de cultivo com Tween 80 foi inferior à observada quando se utilizou sacarose como fonte de carbono. O crescimento do fungo foi relativamente baixo com Tween 80 (Tabela 1).

Com o objetivo de se comparar o efeito do Tween 80 com outros agentes de membrana adicionados ao meio de

Tabela 1 - Atividade das fosfatases repressíveis em diferentes em culturas de *N. crassa*.

Símbolos: * = unidades/h.mg peso seco; (1) = meio de cultura não tamponado; (2) = meio de cultura tamponado.

Fonte de Carbono	Micélio ¹ (mg/ml)	Fosfatase ácida*	Micélio ² (mg/ml)	Fosfatase alcalina*
Sacarose	1,2	4,2	0,9	5,2
Tween 80	0,6	19,8	0,2	2,4

Tabela 2 - Efeito de vários detergentes e sais adicionados ao meio de cultivo de *N. crassa* sobre a secreção das fosfatases repressíveis.

Símbolos: * = concentração final: azida de sódio, 0,2M; Tween 80 e Tween 20, 0,5% (v/v); Triton X-100, 0,001% (p/v); SDS, taurocolato e desoxicócolato de sódio, 0,02% (p/v); NaCl, 0,5M e KCl, 2,0M; ** = significativo ($p < 0,01$).

Adições*	Fosfatase ácida		Fosfatase alcalina	
	Atividade enzimática (U/h.mg)	%	Atividade enzimática (U/h.mg)	%
Controle	6,78	100	9,86	72
Azida de sódio	6,13	100	13,61	100
+ Tween 80	9,79	160	22,09	162
+ Tween 20	9,52	155	19,61	144
+ Triton X-100	6,68	109	16,47	121
+ SDS	9,65	157	21,42	157
+ Taurocolato de sódio	5,83	95	13,11	96
+ Desoxicócolato de sódio	ND	ND	27,20	200
+ NaCl	5,70	93	30,48	224
+ KCl	5,61	92	24,88	183
Teste F	20,24**		33,58**	
Desvio padrão	0,62		1,98	
D.M.S. ($P = 0,05$)	1,79		5,73	

cultura de *N. crassa* suplementado com 1,5% (p/v) de sacarose, sobre a secreção das fosfatases, um conjunto de ensaios foi realizado, sendo que os resultados estão sumarizados na Tabela 2. Após um período de incubação de 6h, verificou-se que não houve diferença significativa entre o controle e o tratamento com azida de sódio. Com relação à fosfatase ácida repressível, observou-se que a atividade aumentou de pelo menos 55% quando se compararam os tratamentos Tween 80, Tween 20 e SDS com azida de sódio. O desoxicócolato precipita em meio ácido, razão porque não foi ensaiado para essa enzima. Com relação à fosfatase alcalina repressível, maior número de compostos

favoreceram a liberação da enzima. A Tabela 2 mostra que Tween 80, Tween 20, SDS, desoxicócolato de sódio, NaCl e KCl diferiram em relação ao tratamento com azida, favorecendo a secreção da enzima em 44 a 124%. O Triton X-100 e o taurocolato de sódio não influíram significativamente sobre a liberação de nenhuma das fosfatases ensaiadas.

A ação desses compostos também foi avaliada sobre a atividade de preparações enzimáticas livres de células. Como se observa na Tabela 3, a adição de Tween 80, Tween 20, Triton X-100, taurocolato de sódio e SDS na mistura de reação da fosfatase ácida diferiu significativamente do tratamento com azida, sendo que com os

Tabela 3 - Efeito de vários detergentes e sais adicionados à mistura de reação sobre a atividade das fosfatases repressíveis de *N. crassa*.

Símbolos: concentração final: azida de sódio , 0,02M; Tween 80 e Tween 20, 0,5% (p/v); Triton X-100, 0,001% (p/v); SDS, taurocolato e desoxicolato de sódio, 0,02% (p/v); NaCl, 0,5M e KCl, 2,0M; ** = significativo ($p < 0,01$); NS = não significativo ($p < 0,01$); ND - não determinado

Adições*	Atividade relativa %	
	Fosfatase ácida	Fosfatase alcalina
Controle	100,0	100,0
Azida de sódio	104,2	93,8
+ Tween 80	160,7	98,2
+ Tween 20	199,0	93,8
+ Triton X-100	134,2	97,1
+ SDS	78,4	101,6
+ Taurocolato de sódio	66,1	98,2
+ Desoxicolato de sódio	ND	94,9
+ NaCl	114,0	87,2
+ KCl	119,00	93,8
Teste F	150,97**	3,04 ^{NS}
Desvio padrão	5,77	4,04
D.M.S. ($P = 0,05$)	16,53	-

três primeiros componentes constatou-se aumento da atividade enquanto que os dois últimos causaram uma redução. Por outro lado, nenhuma variação apreciável da atividade da fosfatase alcalina repressível foi constatada.

Quando se experimentou o efeito da incubação por 1h de concentrações crescentes de Tween 80 sobre a secreção da fosfatase ácida, obtiveram-se os resultados apresentados na Figura 1. O efeito do Tween 80 ocorreu em concentração tão baixa quanto 0,01% (v/v) e, a partir daí, houve um gradual aumento na atividade secretada que culminou com a concentração de 0,75% (v/v). A quantidade de proteína secretada aumentou a medida que se aumentou a concentração do Tween 80 no meio de cultura, verificando-se correlação com os valores de atividade da fosfatase ácida ($t=7,55$).

Em outro conjunto de ensaios, verificou-se o efeito do período de incubação de *N. crassa* após adição de Tween 80 e/ou azida de sódio ao meio de cultura sobre a atividade da fosfatase ácida repressível (Figura 2). Os resultados obtidos mostraram que pela adição de Tween 80 ou Tween

80 + azida de sódio houve um aumento significativo da atividade enzimática em relação aos controles (tratamentos com ou sem azida), mesmo no tempo inicial de incubação. Observou-se também que em ambos os casos a atividade máxima ocorreu após 3 horas da adição do Tween 80, declinando a seguir, enquanto que nos controles a atividade permaneceu invariável durante o tempo do ensaio.

Discussão

Corroborando resultados anteriores (16), verificou-se que a substituição da sacarose por Tween 80 como fonte de carbono, afetou a atividade das fosfatases ácida e alcalina repressíveis e o crescimento de *N. crassa* (Tabela 1). Em particular, a atividade da fosfatase ácida aumentou substancialmente em meio contendo Tween 80.

De forma geral, este trabalho demonstrou com evidência que diferentes compostos adicionados ao meio de cultura podem influir na secreção e/ou atividade dessas enzimas. Assim, a fosfatase ácida teve sua atividade aumentada pela adição

Figura 1 - Secreção da fosfatase ácida repressível em culturas de *N. crassa* contendo concentrações crescentes de Tween 80. As curvas foram obtidas de equações de regressão polinomial. Atividade enzimática (○): $y = 7,58 + 20,72x - 20,16x^2 + 5,66x^3$ (Coeficiente de determinação, $R^2 = 0,71$); Proteína (●): $y = 0,29 + 0,73x - 0,23x^2$ ($R^2 = 0,93$).

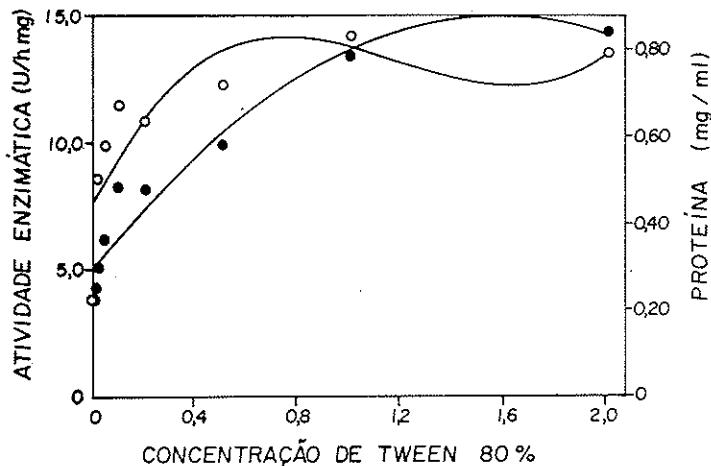
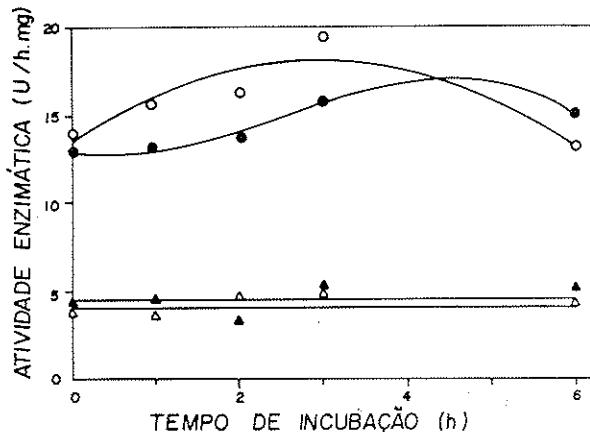


Figura 2 - Efeito do tempo de incubação de *N. crassa* em meio de cultura contendo Tween 80 0,1% (v/v) e/ou azida de sódio 0,02M sobre a secreção da fosfatase ácida repressível. As curvas foram obtidas de equações de regressão polinomial. Tween 80 (○): $y = 13,52 + 3,14x - 0,53x^2$ ($R^2 = 0,84$); Tween 80 + azida de sódio (●): $y = 12,94 - 0,90x + 0,99x^2 - 0,13x^3$ ($R^3 = 0,97$); Nenhuma adição (▲) e azida de sódio (▲) (testes F não significativo).



de Tween 80, Tween 20 ou sulfatododecil de sódio (SDS) enquanto que a fosfatase alcalina foi favorecida por Tween 80, Tween 20,

SDS, desoxicócolato de sódio, NaCl ou KCl. Além dos sais, alguns dos compostos ensaiados são detergentes não iônicos (Tween 80, Tween 20 e

Triton X-100) e outros são detergentes iônicos (desoxicolato de sódio, taurocolato de sódio e SDS). Conforme Reese & Maguire(20), como esses compostos aumentam a liberação dessas enzimas é apenas conjectural, podendo atuar tanto sobre a membrana como nos componentes internos, de modo que a interpretação pode ser mais complexa que uma simples mudança de permeabilidade da membrana. Entretanto, a maior ou menor liberação de enzimas por detergentes é decorrente de sua habilidade de afetar a integridade estrutural de membranas biológicas (1).

Em *Aspergillus niger* (9), de 14 compostos ensaiados, incluindo detergentes, sais e enzimas líticas, apenas estas favoreceram a liberação da fosfatase ácida da parede celular. Em *Paracoccidioides brasiliensis* (22), concluiu-se haver diferenças entre as estruturas de membranas da forma micelial e leveduriforme devido a diferenças na solubilização da sintetase de glucano. Em *N. crassa*, a liberação da fosfatase alcalina por maior número de compostos, pode estar relacionada com sua localização periplasmática (13). Além do mais, a liberação dessa enzima por NaCl e KCl sugere que a mesma estaria ligada por forças eletrostáticas, da mesma forma que a fosfatase alcalina de *Pseudomonas aeruginosa* a qual é liberada em concentrações altas de Mg²⁺ (3).

Além do efeito sobre a liberação de enzimas, a adição desses compostos à mistura de reação também afetou a atividade da fosfatase ácida repressível, mas não da fosfatase alcalina. Assim os detergentes não iônicos ativaram a enzima enquanto que os iônicos a inibiram. Detergentes aniónicos como SDS e Emal-NC inibiram completamente fosfatase ácida de *Aspergillus saitoi* enquanto que outros tipos de detergentes não afetaram a atividade da enzima (17). A fosfatase ácida repressível de levedura de padaria mostrou ser mais sensível ao Triton X-100 que a fosfatase ácida constitutiva (14). De 20 compostos, entre sais e substâncias orgânicas, a fosfatase alcalina repressível foi inibida somente por fosfato e ativada por EDTA (15).

A liberação de fosfatase ácida

aumentou quando a concentração de Tween 80 variou de 0,01 a 2% (v/v), porém a maior atividade correspondeu a uma concentração de 0,75% (v/v). Efeito similar foi conseguido pela utilização de Tween 40 na concentração próxima a 1% sobre a síntese de caroteno (10) ou com o sal KCl que favoreceu a secreção da fosfatase ácida de *Saccharomyces mellis* (26). A atividade da fosfatase ácida repressível se correlacionou com o teor de proteína secretado no meio de cultura, em concordância com os resultados encontrados por Cheng & col. em *Pseudomonas aeruginosa* onde a fosfatase alcalina liberada se correlacionou com o aumento de proteína secretada (3). Esses resultados contrastam com os obtidos por San-Blas & San-Blas (22).

Como foi demonstrado anteriormente (16), a produção e secreção de fosfatases repressíveis está na dependência do crescimento de *N. crassa*. A adição de azida de sódio ao meio de cultura pode provocar severas alterações no metabolismo celular (7, 23), porém seu efeito não afetou a atividade das fosfatases repressíveis de *N. crassa*, porquanto não se verificaram diferenças significativas com o controle. Isso sugere um efeito exclusivo dos compostos ensaiados, diferentemente do que foi obtido por Kaplan (8) onde a atividade de β-glicosidase acessível ao substrato foi reduzida a menos de 5% do controle.

A liberação da fosfatase ácida mostrou ser dependente do tempo, a atividade máxima ocorrendo após 3h da adição do Tween 80. Confirmando outros resultados (Tabela 3), observou-se aqui (Figura 2) um estímulo da atividade da fosfatase no tempo inicial de adição do Tween 80 ao meio de cultura. Esse tipo de resposta também foi obtido quando se utilizou digitonina a 1%, admitindo-se então que a ativação da sintetase de quitina de *Saccharomyces cerevisiae* deva envolver mais que uma mera permeabilização (2).

Summary

Elution of repressible acid and alkaline phosphatases from Neurospora

crassa by detergents and salts

The effect of several chemicals on release of repressible acid and alkaline phosphatases from *N. crassa* was studied. The activity of acid phosphatase was stimulated when Tween 80, Tween 20 and sodium dodecylsulphate (SDS) were added to growth medium while the activity of alkaline phosphatase was enhanced by Tween 80, Tween 20, SOS, sodium deoxycholate, NaCl, and KCl. The nonionic detergents Tween 80, Tween 20, and Triton X-100 stimulated the activity of the acid phosphatase in the reaction mixture while the ionic detergents sodium taurocholate and SDS had inhibited. This effect was not observed with alkaline phosphatase. Increasing concentrations of Tween 80 enhanced the secretion of acid phosphatase and protein. The release of acid phosphatase is time-dependent, the enzyme activity reaching a maximum after 3h of addition of Tween 80.

Agradecimentos

À FAPESP pela concessão de bolsa de pesquisa (nº 83/2437-0) para um dos autores (JCZ).

Referências Bibliográficas

1. Arnold, W.N. & Johnson, B.P. - Effects of polyenes, detergents, and other potential membrane perturbants on an osmotolerant yeast, *Saccharomyces rouxii*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:311-318, 1982.
2. Becker, J.M.; Enari, E. & Loevitzki, A. - Guanine nucleotide regulation of adenylate cyclase in permeabilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 968:408-417, 1988.
3. Cheng, K.J.; Ingram, J.M. & Costerton, J.W. - Release of alkaline phosphatase from cells of *Pseudomonas aeruginosa* by manipulation of cation concentration and of pH. *J. Bacteriol.*, 104:748-753, 1970.
4. Crocken, B. & Nyc, J.F. - Utilization of L- α -glycerophosphorylcholine by a lecithin-deficient strain of *Neurospora crassa*. *Can. J. Microbiol.*, 9:689-696, 1963.
5. Hartree, E.P. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, 48:422-427, 1972.
6. Helenius, A. & Simons, K. - Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 415:29-79, 1975.
7. Jones, O.T.G. - The accumulation of amino-acids by fungi, with particular reference to the plant parasitic fungus *Botrytis fabae*. *J. Exptl. Bot.*, 14:399-411, 1963.
8. Kaplan, J.G. - An inducible system for the hydrolysis and transport of β -glucosides in yeast. *J. Gen. Physiol.*, 48:873-886, 1968.
9. Komano, T. - Properties and biosynthesis of cell wall-bound acid phosphatase in *Aspergillus niger*. *Plant & Cell Physiol.*, 17:537-549, 1976.
10. Krzeminski, L.F. & Quackenbush, F.W. - Stimulation of carotene synthesis in submerged cultures of *Neurospora crassa* by surface-active agents and ammonium nitrate. *Arch. Biochem. Biophys.*, 88:64-67, 1960.
11. Matoo, R.L. & Matoo, P.R. - Effect of detergents on the alkaline phosphatases of *Cuscuta reflexa*. *Phytochem.*, 13:1727-1729, 1974.
12. McDonald, I.J. - Localization of proteinase in cells of a species of micrococcus. *Can. J. Microbiol.*, 8:785-794, 1962.
13. Metzemberg, R.L. - Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*. *Microbiol. Rev.*, 43:361-383, 1979.
14. Mizunaga, T. - Some properties of phosphate-repressible and-constitutive acid phosphatases of baker's yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 43:1211-1218, 1979.
15. Nahas, E. - Controle da produção e excreção das fosfatases ácida (EC 3.1.3.2) e alcalina (EC 3.1.3.1) repressíveis de *Neurospora crassa*: efeito da fonte de carbono e do pH do meio de cultura. RibeirãoPreto, USP, 1981. 114p. (Tese Doutor).
16. Nahas, E.; Terenzi, H.F. & Rossi, A. - Effect of carbon source and pH on the production and secretion of acid phosphatase (EC 3.1.3.2) and

- alkaline phosphatase (EC 3.1.3.1) in *Neurospora crassa*. J. Gen. Microbiol., 128:2017-2021, 1982.
17. Naoi, N.; Beppu, T. & Arima, K. - Acid phosphatase of *Aspergillus saitoi*: purification properties. Agric. Biol. Chem., 41:1835-1840, 1977.
18. NYC, J.F. - A repressible acid phosphatase in *Neurospora crassa*. Biochem. Biophys. Res. Communications, 27:183-188, 1967.
19. NYC, J.F.; Kadner, R.J. & Crocken, B.J. - A repressible alkaline phosphatase in *Neurospora crassa*. J. Biol. Chem., 241:1468-1472, 1966.
20. Reese, E.T. & Maguire, A. - Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. Appl. Microbiol., 17:242-245, 1969.
21. Reese, E.T.; Birzgalis, R. & Mandels, M. - Sucrases in fungi. Can. J. Biochem. Physiol., 40:273-283, 1962.
22. San-Blas, G. & San-Blas, F. - Effect of detergents on membrane-associated glucan synthetase from *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Bacteriol., 152:563-566, 1982.
23. Thevelein, J.M.; Beullens, M.; Honshoven, F.; Hocbeeck, G.; Detremerie, K.; Hollander, J.A.O. & Jans, A.W.H. - Regulation of the cAMP level in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: intracellular pH and the effect of membrane depolarizing compounds. J. Gen. Microbiol., 133:2191-2196, 1987.
24. Vogel, H.J. - A convenient growth medium for *Neurospora*. Microbial Genetics Bull., 13:42-43, 1956.
25. Wang, H.L. - Release of proteinase from mycelium of *Mucor hiemalis*. J. Bacteriol., 93:1794-1799, 1967.
26. Weimberg, R. & Orton, W.L. - Elution of acid phosphatase from the cell surface of *Saccharomyces mellis* by potassium chloride. J. Bacteriol., 90:82-94, 1965.

CELLULOYTIC ACTIVITIES OF HUMICOLA SP

Virginia Maria Ganns Chaves
Daison Olzany Silva

Deptº de Biologia Geral
Universidade Federal de Viçosa
36570 Viçosa MG, Brazil

Walter Brune
& Maurílio Alves Moreira

Deptº de Química
Universidade Federal de Viçosa
36570 Viçosa MG, Brazil

Resumo**Atividades celulolíticas de *Humicola* sp**

O fungo termo-celulolítico *Humicola* sp apresentou alta atividade de exo- β -D-glucanase (C_1) ligada a célula e baixa atividade de endo- β -Glucanase (C_x) ligada a célula e no sobrenadante. Celulose microcristalina foi melhor indutor de celulase e melhor fonte de carbono do que carboximetil celulose. A atividade de β -glucosidase foi medida somente no sobrenadante da cultura e seu valor foi maior quando carboximetil celulose foi usada como fonte de carbono em pH 7.0.

Introduction

Generally fungus cellulases are considered to be extracellular because of their presence in the supernatant. Cellulase activities are measured during fermentation, usually on cell free liquid medium. However the presence of a specific enzyme in the liquid medium is not necessarily proof of its extracellular nature but can also be a result of autolysis (16).

Microbial cellulase has recently become of interest due to its potential use in industrial saccharification of cellulosic substrates and production of single cell protein (SCP).

Rodrigues and Volfová (14) suggested that before practical application of processes such as saccharification or SCP, better knowledge is required of the enzymatic mechanism involving conditions during growth on cellulosic substrates.

Hayashida and Yoshioka (8) reported

the isolation of a thermophilic fungus, *Humicola insolens*, able to produce significant quantitites of cellulase.

The isolation of a thermophilic and cellulolytic fungus, identified as *Humicola* sp, able to grow very quickly on microcrystalline cellulose, due to cellulolytic enzymes under investigation is reported in this paper.

Materials and Methods

Microorganisms - *Trichoderma reesei* QM 9414 from U.S. Army Natick Research and Development Center Command, Natick, Massachusetts was used as comparison to our *Humicola* sp isolated from compost.

Culture conditions - To produce cellulase complex the following ingredients were used per liter of distilled water: KH_2PO_4 2g; K_2HPO_4 7g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g; $(NH_4)_2SO_4$ 1g; supplemented with 0.06% yeast extract,

pH 7.0. For *T. reesei* the following were used per liter of distilled water: KH_2PO_4 2g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.4g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g; CaCl_2 0.3g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1.6mg; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.4mg; CaCl_2 2mg, urea 0.3g, proteose peptone 1g, pH 4.5 (15). Microcrystalline cellulose (cellulose powder, Avicel) or carboxymethyl cellulose were used at 10g as carbon sources. All experiments were done in triplicates, each consisting of 50ml of culture medium in a 250ml Erlenmeyer flask. Mycelium suspension obtained by scraping the surface of fungal growth with an inoculating loop from solid medium in a culture tube was used as inoculum.

Assays - After growth of *Humicola* sp, the cells were harvested by centrifuging at approximately 3000xg for 15 min. Activities of exo- β -1,4 glucanase (EC 3.2.1.74), avicelase or C_1 and endo- β -1,4 glucanase, (EC 3.2.1.4), CMCase or C_x were verified in the supernatant and mycelium. β -glucosidase (EC 3.2.1.21) was assayed only in the supernatant. Microcrystalline cellulose (cellulose powder) was used as inducer and substrate of C_1 . A suspension of 1.1% microcrystalline cellulose was prepared in 0.05M, pH 5.0, acetate buffer. To 20ml of this suspension, 1ml of supernatant was added and when mycelium was used, after rinsing with distilled water and filtration on cheese cloth, the whole mycelium was used in the assay. The reaction was conducted at 40 °C and shaken for 30 min (15). After the incubation period samples of 1ml were taken in duplicates in which 1ml of 0.25N NaOH was added. These samples were centrifuged at approximately 2,000xg for 10 min to remove residual cellulose (15) and the reducing sugars released in hydrolysis reaction were measured by the 3,5 dinitrosalicylic acid method (DNS) as described and modified by Halliwell (7). The absorbance was measured at 540nm on a spectrophotometer (Micronal, mod. Digital B 242).

Carboxymethyl cellulose was used as induced and substrate of C_x . A solution of 0.44% carboxymethyl cellulose in 0.05M acetate buffer pH

5.0 was used. To 20ml of this solution 1ml of supernatant was added or when mycelium was used, it was rinsed with distilled water and filtered through cheese cloth, and the entire mycelium used in the assay. The reaction was conducted at 40°C and shaken for 60 min (15). After the incubation period samples of 1ml were taken in duplicates and the reducing sugars measured by DNS method (7).

Microcrystalline cellulose and carboxymethyl-cellulose were used as inducer of β -glucosidase and its activity was assayed using p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (p-NPG). A solution of 2mM p-NPG in 0.05M acetate buffer pH 5.0 was used. To 1ml of this solution 50-100 μ l of culture supernatant were added. Reaction was conducted at 40°C for 5 min. After incubation 2ml of 1M Na_2CO_3 were added to stop the reaction (10). The p-nitrophenol (p-NP) released was measured at 405 nm in a spectrophotometer (Zeiss, mod. PMQ II). Protein was estimated according to the method of Bradford (4) using bovine serum albumin as a standard. After enzymatic activity determination the mycelium was centrifuged at approximately 2000xg for 10min, rinsed with distilled water and filtered through cheese cloth to remove residual cellulose. Growth was estimated according to the method of Calam (5).

Results and Discussion

Activities of C_1 and C_x were measured by growing *Humicola* sp on mineral salt media with microcrystalline cellulose or carboxymethyl-cellulose as carbon sources (Figure 1).

The fraction C_1 was found only in the mycelium with high activity. The fraction C_x was found in the mycelium and supernatant. Activity of C_1 shows that this microorganism has a greater capacity to hydrolyse microcrystalline cellulose than carboxymethyl cellulose. Since these are inducible enzymes cellulolytic activities depend on the type of cellulose utilized as a substrate. Carboxymethyl cellulose is not adequate for utilization as either substrate or inducer; since its hydrolysis may result in

non-metabolizable carboxymethyl sugars even those with low degrees of carboxylation (10). The low capacity of *Humicola* sp to hydrolyse carboxymethyl cellulose and synthesize Cx may be due to inability to metabolize the resulting sugars of this polymer.

Cellulose complex of *Trichoderma reesei* was considered to be extra-cellular showing activity in the culture media during growth. Vaheri & col. (16) found that high proportions of the activity that hydrolyze filter paper is cell bound and greater than carboxymethyl cellulase activity. This could mean that exo- β -1,4 glucanase, which is identified as the initial enzyme in the highly organized hydrolysis of crystalline cellulose, perhaps is more linked to the cells than endo- β -1,4 glucanase.

Results found agree with the hypothesis of Mandels and Reese (11) in which cellulolytic enzymes initially are cell bounding with cell-cellulose contact essential to begin hydrolysis. Binder and Ghose (3) found that cellulase is not biosynthesized without direct contact of cells and cellulose.

Cellulases of the fungus *Phialophora malorum* are partially cell free and partially cell bounding during growth on cellulose and carboxymethyl cellulose (2). Vaheri & col. (16), growing *Trichoderma reesei* in culture medium with cellobiose as an inducer, found that the ability to hydrolyze filter paper and carboxymethyl cellulose was detected on cell free filtrates immediately after initiating growth. Also they believe that this is the case of growth on cellulose; activities are not detectable on culture medium because of the cellulase absorption on cellulose. Results suggest that cellulases are, at least under these circumstances, excreted in culture medium by living cells of *T. reesei* rather than a result of autolysis. Studies on cellulase production are hard to understand because of enzyme absorption by cellulose as mentioned in many works (9, 12, 13).

Berg and Pettersson (1) suggested that cellulases of *T. viride* are part of cell wall during exponential growth and are only released in culture

medium after substrate hydrolysis. Similar results were obtained by Hägerdall & col. (6) who found that activity of carboxymethyl cellulase decreases on mycelium and increases in the supernatant.

Moreira & col. (12) detected Cl activity in the supernatant and in the mycelium. Hägerdal & col. (6) found that during exponential growth of *Thermoactinomyces Yx* 50% of carboxymethyl cellulase activity associated with the solid part of the culture, and in the stationary phase this activity was found both in the supernatant and in the mycelium.

The fungus grew better on microcrystalline cellulose as a carbon source than on carboxymethyl cellulose (Figure 2). Moreira & col. (12) have shown a relationship between increased enzymatic activity and cellular growth. β -glucosidase activity (Figure 3) was greater when carboxymethyl cellulose was used as carbon source rather than microcrystalline cellulose. Figures 3 and 4 suggest a relationship between the amount of protein in the supernatant and β -glucosidase enzyme. Herr (10) also found greater activity of β -glucosidase when carboxymethyl cellulose was used as carbon source. The lower production of enzyme on microcrystalline cellulose could be the result of a regulatory system of enzymatic synthesis. Small amounts of β -glucosidase would be induced at the initial phase of hydrolysis and at the final phase large amounts would be induced.

Examining cellulase activities of *T. reesei* (Table 1) and *Humicola* (Table 2) after an 11-days growth period showed that the latter species produced greater amounts of C₁ linked to mycelium on mineral salt medium. *T. reesei* in the two culture media presented C₁ and Cx activity only in the supernatant while a greater production was found when fungus was grown on its optimum medium (Table 1).

Humicola and *T. reesei* β -glucosidase production was greater on the, mineral salt medium, pH 7.0, than on rich media, pH 4.5. According to Stenberg cited by Herr (10) β -glucosidase is very sensitive to low pH and *T. reesei* is not considered a good producer of this enzyme which explains the low production even on its more favorable

Table 1 - Cellulase activity (C_1 , C_x and β -glucosidase) in μg of released products per ml per minute, of *Trichoderma reesei* and *Humicola* sp grown respectively at 25 and 40°C for 11 days in optimum medium for *T. reesei*, pH 4.5 and microcrystalline cellulose or carboxymethyl cellulose as carbon source.

Enzyme	Substrate	<i>T. reesei</i>		<i>Humicola</i> sp	
		Mycelium	Supernatant	Mycelium	Supernatant
μg released products. $\text{ml}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$					
C_1	Micro-cellulose	0	12.45	11.61	0
C_x	CM-cellulose	0	10.87	0.39	1.21
β -gluco- sidase	Micro.cellulose	0	0.024	0	0.019
	CM-cellulose	0	0.046	0	0.074

Table 2 - Cellulase activity (C_1 , C_x and β -glucosidase) in μg of released products per ml per minute of *Trichoderma reesei* and *Humicola* sp grown respectively at 25 and 40°C for 11 days in optimum medium for *Humicola* sp, pH 7.0 and microcrystalline or carboxymethyl cellulose as carbon source.

Enzyme	Substrate	<i>T. reesei</i>		<i>Humicola</i> sp	
		Mycelium	Supernatant	Mycelium	Supernatant
μg released products. $\text{ml}^{-1} \cdot \text{min.}^{-1}$					
C_1	Micro-cellulose	0	2.14	18.23	0
C_x	CM-cellulose	0	10.13	1.82	1.21
β -gluco- sidase	Micro.cellulose	0	0.036	0	0.019
	CM-cellulose	0	0.205	0	1.102

Figure 1 - Enzymatic activities of C_1 and C_x of *Humicola* sp.

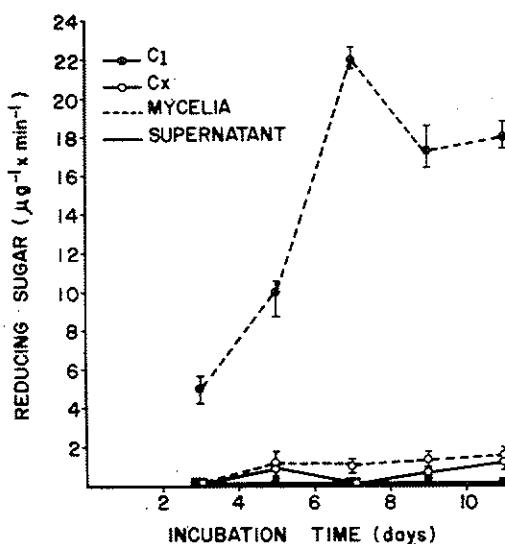
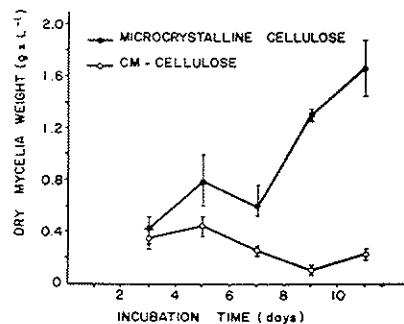
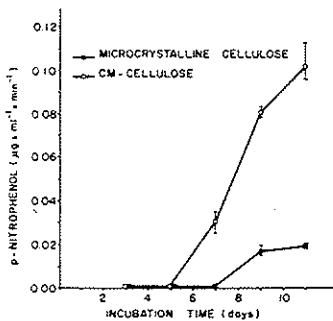
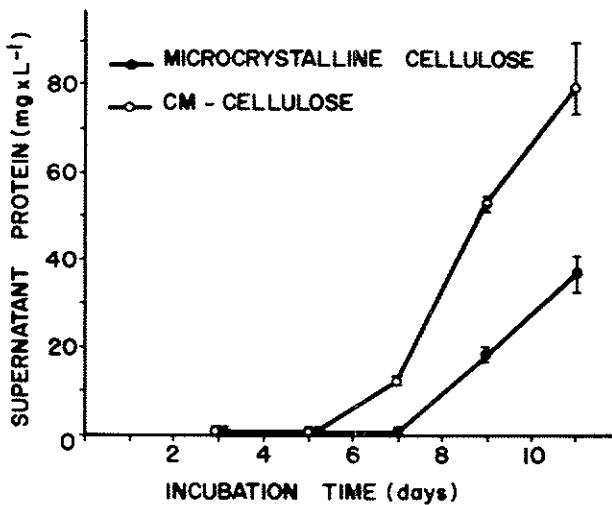


Figure 2 - Growth of *Humicola* sp.Figure 3 - β -glucosidase activity of *Humicola* sp in the supernatant.Figure 4 - Supernatant protein of *Humicola* sp.

medium (Table 1) and greater production on mineral salt medium (Table 2).

Summary

The thermophilic cellulolytic fungus *Humicola* sp, presented high activity of exo- β -D-Glucanase (C_1) bound to cells and low activity of endo- β -D-glucanase (C_x) bound to cells and in the supernatant. Microcrystalline cellulose was a better inducer of cellulase and a better carbon source than carboxymethyl cellulose. β -glucosidase activity was measured only in the supernatant and its value was greater when carboxymethyl cellulose was used as carbon source with a pH of around 7.0.

References

1. Berg, B. & Pettersson, G. - Location and formation of cellulases in *Trichoderma viride*. J. Appl. Bacteriol., 42:65-75, 1977.
2. Berg, B. - Cellulose degradation and cellulase formation by *Phialophora malorum*. Arch. Microbiol., 118:61-65, 1978.
3. Binder, A. & Ghose, T.K. - Adsorption of cellulose by *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng., 20:1187-1199, 1978.
4. Bradford, M. - A rapid and sensitive method for the quantitations of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72:248-254, 1976.
5. Calam, C.T. - The evaluation of mycelial growth. In: Norris J.R. & Ribbons (eds) Methods in Microbiology. Great Britain, vol. 1 p. 567-591, 1969.
6. Hägerdal, B.G.R.; Ferchak, J.D. & Pye, E.K. - Cellulolytic enzyme system of *Thermoactinomycetes* sp grown on microcrystalline cellulose. Appl. Environm. Microbiol., 36:606-612, 1978.
7. Halliwell, G. - Cellulase. In: Bergmeyer, H.U. (ed) Methods of Enzymatic Analysis. England. vol. 3 p. 1134-1142, 1974.
8. Hayashida S. & Yoshioka, H. - Production and purification of thermostable cellulase from *Humicola insolens* YH-8 Agric. Biol. Chem., 44:1721-1728, 1980.
9. Herr, D.; Luck, G. & Dellweg, H. - Formation of cellulases and degradation of cellulose by several fungi. J. Ferment. Technol., 56:273-278, 1978.
10. Herr, D. - Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ITCC-1433 in submerged culture on different substrates. Biotechnol. Bioeng., 21:1361-1371, 1979.
11. Mandels, M. & Reese, E.T. - Induction of cellulase in fungi by cellobiose. J. Bacteriol., 79:816-826, 1960.
12. Moreira, A.R.; Phillips, J.A. & Humphrey, A.E. - Production of cellulases by *Thermonospora* sp. Biotechnol. Bioeng., 23:1339-1374, 1981.
13. Peitersen, N.; Medeiros, J. & Mandels, M. - Adsorption of *Trichoderma* cellulase on cellulose. Biotechnol. Bioeng., 19:1091-1094, 1977.
14. Rodrigues, H. & Volfová, O. - Formation and localization of cellulases in *Cellulomonas* culture on bagasse. Appl. Microbiol. Biotechnol., 19:134-138, 1984.
15. Tanaka, M.; Taniguchi, M.; Matsuno, R. & Kamikubo, T. - Purification and properties of cellulase from *Eupenicillium javanicum*. J. Ferment. Technol., 59:177-183, 1981.
16. Vaheri, M.P.; Vaheri, M.E.O. & Kauppinen, V.S. - Formation and release of cellulolytic enzymes growth of *Trichoderma reesei* on cellobiose and glycerol. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8:73-80, 1979.

Recebido para publicação em 28/4/89

STUDIES ON THE USE OF ALKALOIDS FOR THE SELECTIVE INHIBITION OF WINE YEASTS

Mirian Salvador Pasqual
Juan L. Carrau

Institute of Biotechnology
University of Caxias do Sul
Caixa Postal 1352
95070 Caxias do Sul RS, Brasil

& Patrick Moyna

School of Chemistry
University of the Republic
Montevideo Uruguay

Resumo

Estudos sobre a inibição seletiva de leveduras de uso enológico por alcalóides

Este trabalho testa a utilização de alcalóides em meios de cultura destinados à inibição seletiva de linhagens de uso industrial, permitindo o desenvolvimento de meios diferenciais necessários para técnicas rápidas de caracterização de leveduras, que incluem principalmente a recuperação, estabilização genética e identificação de produtos de fusão obtidos entre as espécies de *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae*.

Introduction

The genetic improvement for oenological yeasts which have been developed by us include combinations of normal culture media with certain components which could work as natural markers (9) for the selective inhibition growth of especific strains (2). Probably due to their marked physiological activity (5), among the several tested active principles, the alkaloids included in commercial media have shown significant results from a microbiological point-of-view.

Then represent a useful tool for the development of new genetic improvement and recovery techniques for fusion products, that makes auxotrophic markers unnecessary replacing them with advantagens by natural markers (3, 8).

Our objectives were the development of media that enable the recovery and identification of fusion products obtained among strains of

Schizosaccharomyces and *Saccharomyces*, so as to permit an evaluation of the possibility of gathering in one genotype, characteres of technological importance.

Material and Methods

Culture Media - YEPD (7) pH 6.5 - Bacto-Yeast Extract 10g; Peptone 20g; Dextrose 20g; Bacto-Agar 20g; and Distilled Water 1000ml.

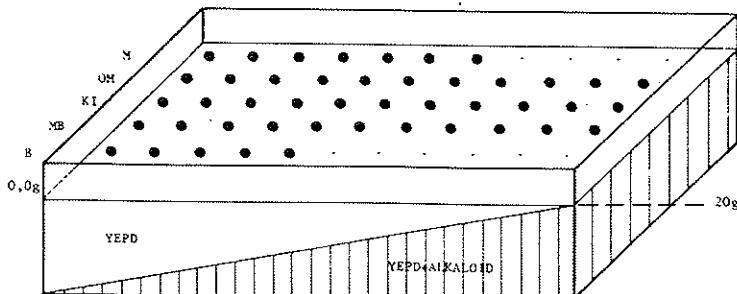
YEPD pH 4.0 - the same composition above with a pH reduced to 4.0 with the aid of a concentrated malic acid solution.

Alkaloides Tested - Atropine Sulfate, B.D.H. (British Drug Houses Ltd.), London; Caffeine, Merck; Euinquine, Merck; Ipecacuanha, Merck; Pilocarpine Hydrochloride, Merck; Quinine Sulfate, Merck; Sparteine Sulfate, Bayer & Cie,

Strains Used

Organism	Strain	Main characteristics	Source/References	Abbreviations
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Montrachet	Oenological use	Universal Food Corporation, USA	M
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KI	Bearer of Killer character	INRA, Montpellier, France	KI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	O Mendonza	Very fast growing and pectinase producer	Fac.Ciências Agrárias, Mendonza, Argentina	OM
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Benda I	High ability to decompose malic acid	Bayerische Landesanstalt für Wein, Würzburg, Germany	B
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	MB6TC	Fusion product between Montrachet and Benda I	Instituto de Biotecnologia, Caxias do Sul, Brasil (2)	MB
<i>X Schizosaccharomyces pombe</i>				

Figure 1 - Scheme of the Gradient Technique.



Paris; Strychnine, Merck; Teophylline, Merck; Veratrine, Merck.

Verification of Inhibition Rings - The Montrachet and Benda I yeasts were plated on "pour-plate" with YEPD pH 6.5 and YEPD pH 4.0, then 0.02g of each alkaloid was added in points over the media. Incubation was carried out at 28 °C for 48hs.

The Gradient Technique (4) - Gradient glass plates (14.0cm length x 9.0cm large x 3.5cm deep) were prepared by using 75.0ml of slanted YEPD pH 6.5 with 2.0g of alkaloid added. After solification 75.0ml of no-alkaloid YEPD pH 6.5 were placed on the upper part. A 48 hours diffusion makes possible to have concentrations in a range from 0.0g (left side) to 2.0g (right side) in the plates (see picture above). The Montrachet, O Mendonza, KI, MB6TC and Benda I yeasts were inoculated in points. Incubation was carried out at 28° C for 48hs.

Results

The results of inhibition produced by alkaloids on Benda I and Montrachet in YEPD pH 6.5 can be seen on Table I. Sparteine, ipecacuanha and teophylline inhibited neither of the two strains at the tested pH and concentrations. On the other hand atropine, caffeine and strychnine, inhibited these yeast at both pH 4.0 and 6.5, showing little influence of pH on the alkaloid toxicity. Pilocarpine inhibited the Montrachet strain only at pH 6.5 - not at the pH 4.0; veratrine inhibits Montrachet and Benda I, but only at pH 6.5. Quinine does not inhibit Benda I at pH 4.0, differently from euganine, which inhibits both Benda I and Montrachet but only with the pH 4.0.

Table II shows the results obtained for different strains with the gradient technique using alkaloids. Strychnine, teophylline, euganine, sparteine sulfate and ipecacuanha produce no strain inhibition at the concentration used. The alkaloids pilocarpine hidrochloride, euganine, veratrine, caffeine, quinine sulfate and atropine sulfate selectively inhibit certain strains when utilized at the concentration 2.0g/75.0ml, with the gradient technique.

Table 1 - Inhibition of yeast growth by alkaloids.

Alkaloids	Strains/Medium		YEPD pH 6.5		YEPD pH 4.0	
	Saccharomyces cerevisiae Montrachet	Schizosaccharomyces pombe Benda I	Saccharomyces cerevisiae Montrachet	Schizosaccharomyces pombe Benda I	Saccharomyces cerevisiae Montrachet	Schizosaccharomyces pombe Benda I
Atropine Sulfate	+	+	+	+	+	+
Caffeine	+	+	+	+	+	+
Euquinine	-	-	+	+	+	+
Ipecacuanha	-	-	-	-	-	-
Pilocarpine Hydrochloride	+	-	-	-	-	-
Quinine Sulfate	+	+	+	+	-	-
Sparteine Sulfate	-	-	-	-	-	-
Strychnine	+	+	+	+	+	+
Theophylline	-	-	-	-	-	-
Veratrine	+	+	-	-	-	-

Table 2 - Verification of growth inhibition by using the gradient technique.

Alkaloids	Level of inhibition				
	M	OM	KI	MB	B
Atropine Sulfate	+	*	*	+	*
Caffeine	-	+	+	-	+
Euquinine	*	*	*	*	*
Ipecacuanha	*	*	*	*	*
Quinine Sulfate	+	+	+	-	+
Pilocarpine Hydrochloride	*	*	*	*	+
Sparteine Sulfate	*	*	*	*	*
Strychnine	*	*	*	*	*
Theophylline	*	*	*	*	*
Veratrine	*	*	-	-	-

General Discussion

The results obtained showed different modes of action (total growth, parcial growth and no growth) for the alkaloids tested. Inhibition of strains of different yeasts depended, in part on the pH of the medium used.

The selective inhibition of certain strains, as observed with the gradient technique (4), makes those alkaloids likely to be used as natural markers in differential media for fast identification of clones, outnumbering studies (1) and also on genetic improvement programs as parental inhibition factors. However, one should also take into consideration the water medium, so that mixtures could be homogeneous. Since caffeine, veratrine, quinine and euquinine are not totally soluble, the most recommended alkaloids are atropine and pilocarpine, due to their good solubility in culture medium, which make it possible precise and reproducible results, so that especial selective media can be obtained for

the purposes referred to above.

Summary

This work tests the use of alkaloids in culture media destined for selective inhibition of industrial yeasts, making it possible to develop differential media for fast yeast characterization and identification of fusion products obtained among strains of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq/UCS and the PEDECIBA (PNUD URU 002/84) Programs.

References

- Barros, N.M.; Carrau, J.L.; Serafini, L.A. & Dillon, A.J.P. - The use of differential culture media for the control of

- outhumbering with cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast Newsletter, 23(2):101, 1984.
2. Carrau, J.L.; Azevedo, J.L.; Sudbery, P. & Campbell, D. - Methods for recovering fusion products among oenological strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. Rev. Brasil. Genet., 1:221-226, 1982.
3. Carrau, J.L. - A fusão de esferoplastos como uma ferramenta para o desenvolvimento de leveduras de vinificação. In: Genética de Microrganismos em Biotecnologia e Engenharia Genética (Azevedo, J.L., ed.) FEALQ, Piracicaba, SP, p.115-121, 1985.
4. Davenport, R.R. - Outline guide to the use of media and a selection of methods for yeasts and yeast like organisms. In: Yeasts: their biology and activities. (Skinner, F., Passmore, S.M. & Davenport, R.R. eds.) M. Ingram Memorial Symposium, Newcastle-upon-Tyne, July, 1979.
5. Goodman, L.S. & Gilman, A. - The pharmacological basis of therapeutics, 4th Edition, Copyright, New York, 1970.
6. Makower, M. & Bevan, E.A. - The inheritance of a Killer Character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Proceedings 11th Internat Congress Genetics, 1:202 (abstract), 1963.
7. Mortimer, R.K. & Hawthorne, D.C. - Yeast Genetics. In: The Yeasts, Vol. 1, (Rose, A.H. & Harrison, J.S. eds). p.391, 1969.
8. Pasqual, M.S.; Serafini, L.A.; Dillon, A.J.P.; Carrau, J.L.; Yazbek-Silva, L.C.A. & Zugno, M.T. - Second generation of fusion products among strains of enological interest. Yeast Newsletter, 25(1):32, 1986.
9. Serafini, L.A.; Carrau, J.L.; Barros, N.M.; Lemos, M.Z. & Souza, O.L.G. - Studies on methods to detect natural markers in yeast clones for industrial use. Yeast Newsletter, 23(2):101, 1984.

Recebido para publicação em 30/3/89

CHARACTERIZATION OF A THERMOPHILIC AND CELLULOLYTIC HUMICOLA SP ISOLATED FROM COMPOST

Virgínia Maria Ganns Chaves
Daison Olzany Silva

Deptº de Biologia Geral
Universidade Federal de Viçosa
36570 Viçosa MG, Brazil

Walter Brune
& Maurílio Alves Moreira

Deptº de Química
Universidade Federal de Viçosa
36570 Viçosa MG, Brazil

Resumo

Caracterização do fungo Humicola sp termo-celulolítico isolado de composto

A espécie termofílica do fungo *Humicola* sp, capaz de crescer em celulose como fonte de carbono, foi isolada de composto. O fungo apresentou melhor crescimento a temperatura de 40°C e pH 6.0. A ausência de K⁺ ou a presença de citrato a 10mM em meio de cultura inibiram seu crescimento. A inibição na presença de citrato foi devida a seu efeito quelante de Mg⁺⁺. O fungo foi capaz de utilizar as seguintes fontes de carbono: acetato, ágar-ágar, amido, carboximetilcelulose, celobiose, glucose, lactose, manose e xilose.

Introduction

Thermophilic cellulolytic microorganisms have advantages over mesophilics such as fast growth, increased enzymatic activity and more stable enzymatic system at high temperatures, thus allowing better use in industrial microbiology (4).

Even though many microorganisms hydrolyse cellulose, this hydrolysis is, usually, very slow due to the inadequate proportion of enzymes make part of the cellulase system as well as the low capacity of synthesis (10).

Among the microorganisms able to hydrolyze cellulose are *Ruminococcus albus*, *Cytophaga* spp., *Cellulomonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum* and *Fusarium solani* (7, 11).

The isolation from compost of a thermophilic species of *Humicola* which

presented a high growth rate with cellulose brought interest and its physiology was studied.

Materials and Methods

Isolation and culture of the microorganism - The thermophilic fungus used was isolated from a grass and bovine manure compost by direct isolation using a solid selective medium at 42°C (2).

The medium consisted of (analytical grade chemicals per liter of distilled water): KH₂PO₄ 7g; K₂HPO₄ 2g; MgSO₄·7H₂O 0.1g; (NH₄)₂SO₄ 1g; pH 7.0; supplemented with yeast extract 0.06% and cellulose powder (native cellulose thin layer chromatography, Merck) 1%. The medium was solidified by adding 15g of agar-agar. After purification the culture was maintained at room temperature in test tubes containing

PDA (potato dextrose agar).

Characterization - Optimum growth temperature was determined by incubating liquid cultures at temperatures of 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 and 60°C. pH growth range was determined in 0.1M buffer solutions. HCl-Glycine for pH 3.0 to 3.5; acetate buffer for pH 3.5 to 6.0; and phosphate buffer for pH 6.0 to 8.0 (3). Dependency on potassium as a growth factor of the fungus was determined by substituting sodium. The culture medium used had a potassium concentration of 95mM using potassium phosphate. The culture medium was supplemented with sodium phosphate to maintain an anion concentration of 95mM. The use of different carbon sources was verified in liquid culture in which the carbon sources were: acetate, agar-agar, starch, carboxymethyl-cellulose, cellobiose, powdered cellulose, citrate, glucose, lactose, mannose or xylose at 0.25%. Citrate inhibition in the range from 0 to 20mM was determined by cultivating the fungus in mineral salt medium supplemented with yeast extract 0.06% and glucose 0.02M as carbon source. Three series were established, the first with no added citrate, the second with citrate and inoculated at time zero; and the third with citrate added after 36h of growth.

Each treatment was done in three replicates with one 250ml Erlenmeyer flask containing 50ml of culture medium being a replicate. A mycelium suspension obtained from a 14 day old culture grown at 40°C, was prepared by flooding and then scraping the surface of the medium with an inoculating loop. Characterization, except when mentioned, was done by cultivating the fungus at 40°C for 120h in the culture media already described using glucose 0.02M as carbon source supplemented with 0.06% yeast extract.

Growth determination - Growth was determined by dry weight. The material was centrifugated at approximately 3000g for 15 minutes at room temperature, washed twice with distilled water, placed in weighing bottles, dried at 80°C to constant weights (5).

Results and Discussion

The isolated fungus was identified as *Humicola* sp by Drs. M.P. Corlett and S.J. Hughes (Biosystematics Research Institute, Ottawa, Canada). The fungus grew at temperature ranging from 20 to 60°C (Figure 1) for 120h, with the optimum temperature for growth being to 40°C. Alexopoulos and Mims (1) define a thermophilic fungus as one with optimum growth temperatures between 35-40°C and that grows in the range of 20 to 50°C, therefore *Humicola* sp is thermophilic.

The fungus presented better growth in pH 6.0 (Figure 2) with growth inhibition below pH 6.0. The dissymmetry presented by the curve (Figure 2) can be related to observations of fungus dependency on the K⁺ cation (Figure 3) for its growth. The K⁺ is required in a minimum concentration of 9.5mM for growth and 19mM for optimum growth. Harold (6) reported that the accumulation of K⁺ is compensated by proton efflux or concurrent anion accumulation. Stock and Roseman (14) established that the melibiose permease system of *S. typhimurium* requires as co-transport Na⁺ cation. Silva and Dobrogosz (12) showed that this co-transport is associated to the proton efflux of cells. Transport regulation of glucose in filamentous fungi is known to be tied to the activity of K⁺/H⁺ ATPase and thus subjected to the cell energy state control (8).

The fungus was able to grow in 10 of the 11 carbon sources tested (Figure 4). The hydrolysis of cellulose is attributed to the endoglucanase and exoglucanase fractions which acting in synergism are able to hydrolyse the crystalline form. Growth in this carbon source shows that the fungus is cellulolytic.

Citrate is known to chelate bivalent metal ions that are required for metabolic activity (9). Citrate in the concentration of 10mM was sufficient to inhibit the growth of the fungus (Figure 5). Growth inhibition by citrate can be explained by its chelating effect with Mg⁺⁺, required as a co-factor for the phosphotransferases or with other mineral ions present in the media such

Figure 1 - Optimum growth temperature for *Humicola* sp.

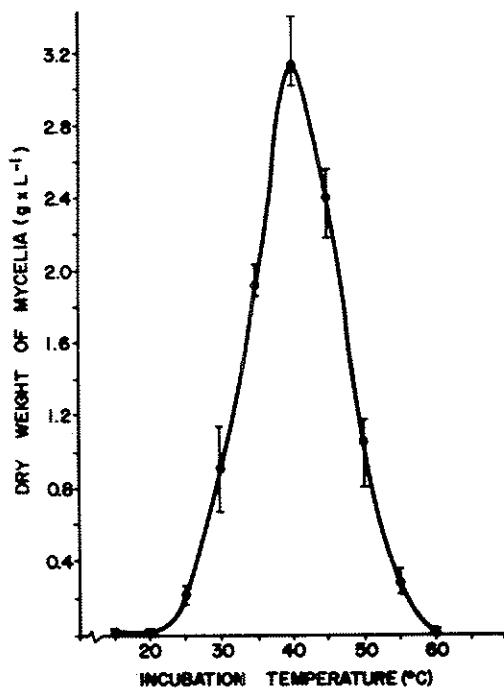


Figure 2 - Optimum growth pH for *Humicola* sp.

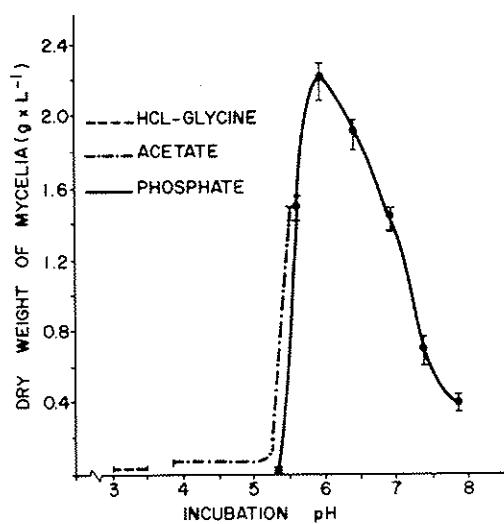


Figure 3 - Potassium growth dependency for *Humicola* sp.

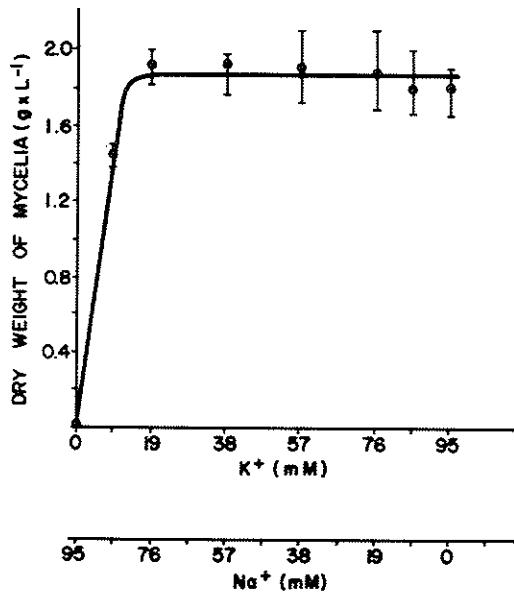


Figure 4 - *Humicola* sp growth on different carbon sources.

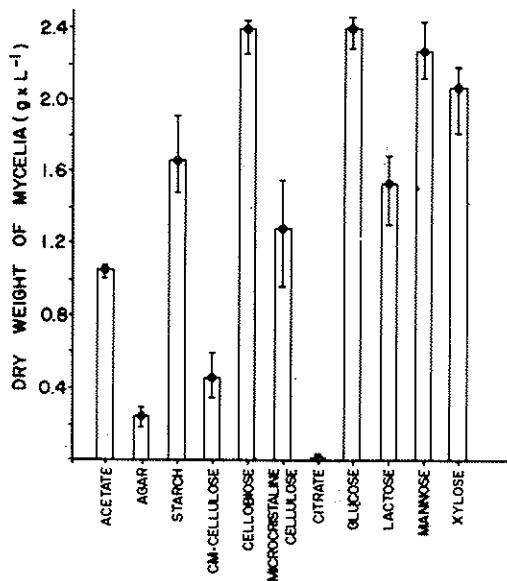


Figure 5 - Citrate growth inhibition.

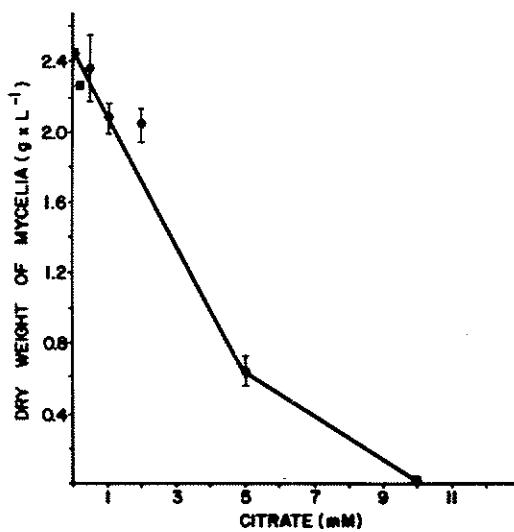


Figure 6 - Citrate growth inhibition added at time zero and at 36h.

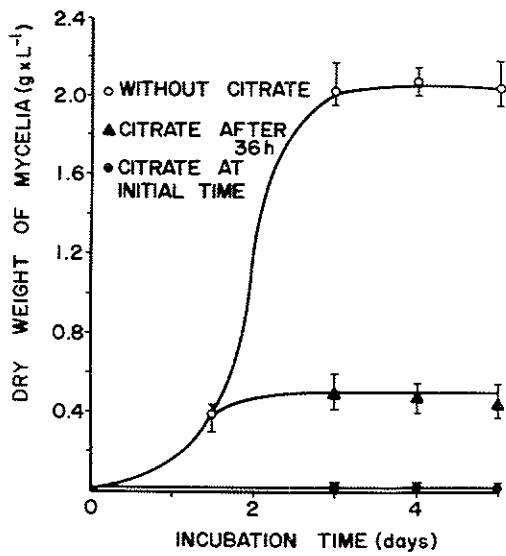
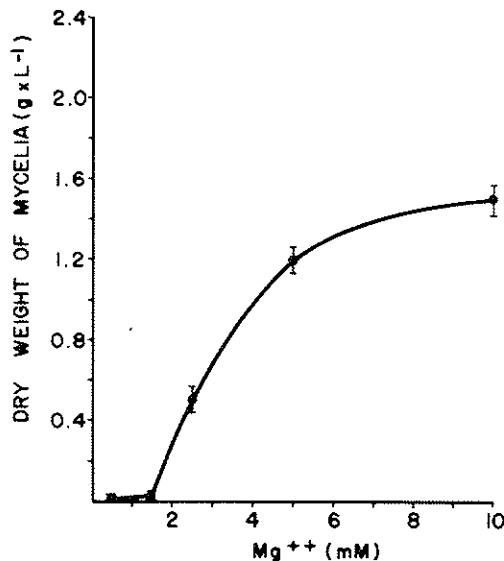


Figure 7 - Citrate inhibition overcome by Mg^{++} .



as Cu^{++} or Fe^{++} , necessary for cellular growth (1).

Addition of citrate to the culture medium in the final concentration of 20mM at time zero and at 36h after growth initiation (Figure 6) resulted in inhibition of fungus growth. If citrate acted as a chelating agent, one could suppose that in 36h the metallic ions necessary for the fungus growth were not absorbed in sufficient levels so that it could grow at a normal rate in citrate presence. Citrate addition after 48h of growth did not cause an inhibitory effect (data not shown). Souw and Demain (13) observed that 20h is sufficient time for the *Xanthomonas campestris* grown in fermentor to absorb all the metallic ions necessary for its growth, and even in the presence of citrate, growth was not affected. The chelating effect of citrate was confirmed when the inhibitory effect of citrate was overcome by increasing amounts of Mg^{++} (Figure 7).

Summary

A thermophilic species of *Humicola* sp,

able to utilize cellulose, was isolated from manure compost. The fungus presented better growth at a temperature of 40°C a pH 6.0. Absence of K^{+} or presence of citrate at 10mM in culture medium inhibited its growth. Inhibition in the presence of citrate was due to its chelating effect with the Mg^{++} ion. The fungus was able to utilize as carbon sources: acetate, agar-agar, starch, carboxymethylcellulose, cellobiose, cellulose, glucose, lactose, mannose and xylose.

References

1. Alexopoulos, J. & Mims, C.W. - Introductory Mycology, 3rd edn. John Wiley & Sons, New York, 1979.
2. Amaral, D.; Costa, S.O.P.; Schwab, A.; Oliveira, E.N.S.; Branco, C.L.; Cury, A. & Travassos, L.R. - Experimentos de Microbiologia Geral, 3rd edn. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil, 1967.
3. Bacila, M. - Curso de fisiologia de microrganismos. Universidade Federal do Paraná, Curitiba,

- Brazil, 1960.
- 4. Bellamy, W.D. - Role of thermophiles in cellulose recycling. *ASM News* 45:326-331, 1979.
 - 5. Calam, C.T. - The evaluation of mycelial growth In: Norris, J.R. & Ribbons, D.W. (eds) *Methods in Microbiology*, vol. 1. Academic Press, London, U.K., p.567-591, 1969.
 - 6. Harold, F.M. - Conservation and transformation of energy by bacterial membranes. *Bacteriol. Rev.* 36:172-230, 1972.
 - 7. Herr, D. - Secretion of cellulase and β -glucosidase by *Trichoderma viride* ATCC-1433 in submerged culture on different substrates. *Biotechnol. Bioeng.*, 21:1361-1371, 1979.
 - 8. Jennings, D.H. - The Filamentous Fungi. Vol. 2. Smith, J.E., Berry, D.E. (eds). Edwards Arnold, London, 32-64, 1975.
 - 9. Mischa, K.H.; Kubicek, C.P. & Röhr, M. - Citrate inhibition of glucose uptake in *Aspergillus niger*. *Lett.* 6:425-430, 1984.
 - 10. Reese, E.T.; Siu, R.G.H. & Levinson, H.S. - The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. *J. Bacteriol.*, 59:485-497, 1960.
 - 11. Shin, S.B.; Kitagawa, Y.; Suga, K.J. & Ichikawa, K. - Cellulase biosynthesis by *Trichoderma viride* on soluble substrates. *J. Ferment. Technol.*, 56:396-402, 1978.
 - 12. Silva, D.O. & Dobrogosz, W.J. - Proton efflux associated with melibiose permease activity in *Salmonella typhimurium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 83:750-755, 1978.
 - 13. Souw, P. & Demain, A.L. - Role of citrate in santhan production by *Xanthomonas capestri*. *J. Ferm. Technol.*, 58:411-416, 1980.
 - 14. Stock, J. & Roseman, S. - A sodium-dependent sugar cotransport system in bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44:132-138, 1971.

EFEITOS DA TEMPERATURA E UMIDADE DO SOLO SOBRE *Pythium splendens*

Yvo de Carvalho

Deptº Fitossanitário
Escola de Agronomia
Universidade Federal de Goiás
Caixa Postal 131
74000 Goiânia GO, Brasil

& Adauto Ivo Milanez

Seção de Micologia e Líquenologia
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01051 São Paulo SP, Brasil

Resumo

As populações de *Pythium splendens* Braun, em Latossolo Vermelho-Escuro com 16% de umidade, não foram grandemente afetadas pela temperatura na faixa entre 9° e 33°C, mas a colonização de sementes de melão (*Cucumis melo* L. cultivar "Valenciano") foi suprimida a 12° e a 36°C. Houve interação entre umidade do solo e temperatura, e a mais alta taxa de colonização de sementes ocorreu a 25°C em solo com 24% de umidade.

Introdução

A temperatura do solo pode ser influenciada pelas condições climáticas, vegetação de cobertura, teor de umidade e profundidade (4). Flutuações de temperatura são mais frequentes do que temperatura constantes. Em meio de batata-cenoura-ágar, as temperaturas mínima, ótima e máxima para crescimento de *Pythium splendens* foram 5°, 25° e 34°C, respectivamente (12). Robertson (16) verificou que *P. splendens* apresentou apenas traços de crescimento a 5° e 40°C, sendo maior taxa de crescimento micelial, 37mm/dia, a 30°C.

A melhor temperatura para *Pythium* spp no solo, segundo Rajan & Singh (15) foi de 20°C. Lumsden et al (11) encontraram correlação negativa entre elevação de temperatura do ar e população de *P. aphanidermatum* e *Pythium* spp no solo. A incidência de tombamento de pré-emergência em açafrão bastardo cultivar "Gila" (*Carthamus tinctorius* L.) causado por *P. splendens*, foi de 100% a 16° e 20°

C, e de 86% a 32°C (8). Em viveiros de dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) o sombreamento reduziu a incidência de *P. splendens* e *Rhizoctonia lamellifera* (1).

Tendo em vista a insuficiência de dados sobre o comportamento de *P. splendens* no solo, foram montados, sob condições controladas, dois experimentos para avaliar os efeitos da temperatura e da umidade do solo sobre as populações desse fungo

Material e Métodos

Utilizou-se cepa heterotática de *P. splendens* fornecida por F.C. Albuquerque e isolada de pimenta do reino (*Piper nigrum* L.), no Estado do Pará e responsável por podridão radicular e tombamento (2). *P. splendens* é espécie que geralmente se comporta como heterotálica, somente formando órgãos de reprodução sexuada quando culturas compatíveis são colocadas em contacto. Não produz zoosporos, como a grande maioria de espécies do gênero. Forma dilatações

hifálicas esféricas, também conhecidas como esporângios e aqui denominadas de propágulos. Colônias de *P. splendens*, com 5-6 dias, crescidas à temperatura ambiente, em placas de petri com água destilada esterilizada e sementes de cânhamo (*Cannabis sativa L.*), com abundância de esporângios (12), foram inoculadas ao solo, após agitação para rompimento do micélio. O solo utilizado foi Latossolo Vermelho-escuro, argilo-arenoso, de baixa fertilidade, 1,54% de matéria orgânica, pH 5,1, capacidade de retenção de água 32,6%, procedente de Goiânia, GO. O solo foi peneirado (20 mesh), autoclavado a 110°C por 120 minutos e a umidade reajustada para 16%, antes da inoculação. As estimativas de população de *P. splendens* foram realizadas pelo método de frequência em diluições em placas, descrito por Harris & Sommers (6), modificado por Lumsden et al (10), com o meio "Corn Meal Agar" suplementado com antibióticos, CMA-10 ("Corn Meal Agar", 17g/l; penicilina G sódica, 100 ug/ml, estreptomicina 50ug/ml e pimaricina 10ug/ml. As contagens de esporângios foram feitas com microscópio estereoscópico Carl Zeiss com auxílio de um disco plástico quadriculado de 2mm inserido em uma das oculares, conforme descrito por Carvalho (3).

Efeito da temperatura do solo sobre a população e colonização - As concentrações iniciais foram de 3.880 e 497pv/gss (propágulos viáveis/grama de solo seco), respectivamente, no primeiro e segundo ensaios. Para estudar o efeito da temperatura sobre a flutuação populacional de *P. splendens* foram utilizadas as de 9°, 12°, 15°, 18°, 21°, 24°, 27°, 30° e 33°C, em solo com 16% de umidade. Para cada temperatura foram preparadas três aliquotas de 100g de solo infestado, cada uma acondicionada em saco plástico (25x10cm). Os sacos foram cuidadosamente fechados, envolvidos em papel alumínio e incubados, na temperatura relativa a cada tratamento, por 15 dias. Decorrido esse período, determinou-se a população do fungo em cada aliquote. O delineamento experimental foi o de blocos casualizados.

Nos ensaios sobre a colonização, a

população de *P. splendens* no solo, em dois ensaios consecutivos, foi de 892pv/gss, e o teor de umidade foi de 16%. As temperaturas testadas foram 12, 18, 24, 30 e 36°C. As aliquotas de solo foram preparadas como descrito acima e, a seguir, foram introduzidas 50 sementes previamente fervidas de melão em cada aliquote. Os sacos foram fechados, envolvidos em papel alumínio e incubados por 24 horas, na temperatura relativa a cada tratamento. Testes preliminares indicaram que esse tempo é suficiente em condições ambientes. Decorrido o prazo de incubação as sementes foram retiradas do solo, lavadas em água corrente e plaqueadas em CMA-10. Incubou-se a 25°C por 24 horas, e determinou-se o número de sementes das quais se originaram hifas de *P. splendens*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco repetições,

Efeito da interação temperatura x teor de umidade do solo sobre a capacidade de colonização de *P. splendens* - A população inicial de *P. splendens* foi de 892pv/gss, em três ensaios consecutivos, e a umidade foi ajustada para 16, 25, 32, 32,6%, conforme procedimento descrito por Carvalho (3), incubando-se as amostras em câmaras de temperatura (Campos Salles Ltda). Esses teores de umidade do solo foram combinados com as temperaturas de 15 e 25°C. Para cada tratamento foram preparadas cinco aliquotas de 200g de solo infestado. O procedimento na aferição dos resultados e o delineamento experimental foram os mesmos do ensaio anterior.

Resultados e Discussão

Efeito da temperatura do solo a população e colonização - A flutuação populacional de *P. splendens*, expressa na Tabela 1, por efeito da temperatura, nos limites de 9 a 33°C, foi pouco significativa. As populações foram mais elevadas em solos mantidos a 24°C e mais baixas naqueles incubados a 9 e 15°C. Há indicações de que temperaturas, dentro dos limites estudados, não obstante ser fator importante no crescimento e esporulação do fungo, não afeta

Tabela 1 - Flutuação populacional e taxas de colonização de sementes de melão por *P. splendens* em solo sob diferentes temperaturas
 Símbolos: * = média de dois ensaios; ** = médias seguidas de mesma(s) letra(s) não diferem estatisticamente entre si; *** = não analisado estatisticamente.

Tratamentos (Temp.°C)	População (log %)	Sementes colonizadas* (%)***
9	0,9252* B**	----
12	0,9567 AB	0,0
15	0,9375 B	----
18	1,0039 AB	96,0
21	0,9452 AB	----
24	1,0400 A	100,0
27	0,9834 AB	----
30	0,9895 AB	100,0
33	0,9761 AB	----
36	-----	0,0
C.V.	4,42	----
DMS (Tukey 5%)	0,0811	----

grandemente a viabilidade de esporângios no solo. Em solos mantidos por 15 dias a 9°C, a redução populacional de *P. splendens* foi de 28,7%. Condições de temperatura mais baixas no solo afetam a sobrevivência dos propágulos, todavia não são frequentes em solos de regiões tropicais e sub-tropicais. Embora não tenham ocorrido diferenças significativas entre ensaios, respostas mais consistentes foram encontradas em solos com população mais baixa (497pv/gss).

Os resultados obtidos não evidenciam correlação linear entre variações de temperatura e flutuação populacional de *P. splendens*, o que está de acordo com os resultados obtidos para *P. ultimum* na Califórnia (13). Kenerley & Bruck (7) verificaram correlação entre temperatura do solo e densidade de propágulos de *Phytophthora cinnamomi* em canteiros de *Abies fraseri*.

As taxas de colonização de sementes de melão submersas no solo (Tabela 1) foram mais elevadas sob temperaturas de 24 a 30°C, coincidindo com a faixa ótima de crescimento micelial de *P.*,

splendens. A taxa de colonização foi reduzida mais rapidamente com o aumento de temperatura do que com sua redução, coincidindo com os achados de Hancock (5) para *P. ultimum*. A taxa de colonização foi nula a 12 e 36°C, níveis em que o crescimento micelial ainda ocorre em meio de cultura, evidenciando que a colonização requer maior atividade do fungo. É possível que exposições mais prolongadas do substrato no solo infestado resultem em colonização em temperaturas mais baixas. Resposta similares foram obtidas com *P. aphanidermatum* e *P. myriotylum* que cresceram em ágar V-8 a 15°C, mas não afetaram o "stand" em solos semeados com centeio e mantidos nessa temperatura (9).

Efeito da interação temperatura x umidade do solo sobre a capacidade de colonização - A taxa de colonização de sementes de melão (Tabela 2), a 25°C, foi máxima em solos com 24% de umidade e mínima em solo saturado (32,6%). A influência da temperatura sobre a colonização por *P. splendens* foi mais acentuada em solos saturados de

Tabela 2 - Taxa de colonização de sementes de melão por *P. splendens* em solos com diferentes níveis de umidade e temperatura.
 Símbolos: * = excluído da análise estatística devido à ausência de variabilidade. Difere dos demais tratamentos; ** = média de três ensaios com cinco repetições; *** = médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si.

Tratamentos		Sementes colonizadas (%)
Umidade do solo (%)	Temperatura (°C)	
16	15	92,74** A***
16	25	98,60 A
24	15	92,04 A
24	25	100,00* -
32,6	15	88,24 A
32,6	25	56,14 B
C.V. (%)		6,47
DMS (Tukey 5%)		10,48

umidade do que a 16 e 24%. Observou-se que, em solos com o mesmo teor de umidade, a taxa de colonização foi mais elevada em temperatura mais alta, exceto naqueles com 32,6% de umidade, quando ocorreu, em três ensaios, situação inversa. Essas diferenças foram estatisticamente significativas, exceto em solos com 16% de umidade. Essa ocorrência, aparentemente incomum, em solos mais úmidos, pode ser devida à competição ou antagonismo com a microbiota, notadamente bactérias, que acompanha as sementes. Contrapõem-se a esta possibilidade o rápido crescimento de *P. splendens* e o curto período (24 horas) de exposição do substrato no solo.

Os resultados aqui relatados são comparáveis com os de Aderungboye & Esuruoso (1) e Rajagopalan (14) em que o sombreamento de viveiros de dendzeiro na Nigéria, resultou em menor incidência de queima de plântulas causada por *P. splendens* e *Rhizoctonia lamellifera*.

Summary

Efêcts of soil temperature and moisture on Pythium splendens Braun

To study the effects of soil temperature and moisture on populations of *Pythium splendens*, a heterothallic isolate of this oomycete causing root rot and damping-off in *Piper nigrum* from Pará State, was maintained in corn meal agar plus sodic penicillin G, streptomycin and pymaricin. Colonies of the fungus, with abundant sporangia, 5-6 days old, grown in sterile petri dish with sterile distilled water and halves of hemp seeds (*Cannabis sativa*), were inoculated into the soil after disruption of the mycelial hyphae. Soil used in the experiments was a sandy clay dark-red latosol, with 1.54% of organic matter, pH 5.1, low fertility and field water capacity of 32.6%, from Goiânia, Go. Prior to utilization it was sterilized by

autoclaving at 110°C for 120 minutes, and the moisture content adjusted to 16%. Measurements of *P. splendens* populations were given in number of viable propagules (sporangia) per gram of dry soil (pv/gss) using a modified plate dilution frequency technique. Sporangia counts were made with a Carl Zeiss stereoscopic microscope using a plastic disc divided into 2mm squares in one of the eyepieces. In the colonization experiments 50 melon seeds (*Cucumis melo* cultivar "Valenciano") were added to each soil aliquot of 100 or 200g enclosed in plastic bags. For each parameter, temperature and soil moisture, at least two repetitions were conducted and the data were statistically analysed. Populations of *Pythium splendens* in sterilized soil with 16% of moisture were not greatly affected by temperature in the range of 9° to 33°C, but melon seed colonization by the fungus was suppressed at 12° and at 36°C. There was interaction between soil moisture and temperature, and the highest rate of melon seed colonization has occurred at 25°C with 24% of soil moisture.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão de bolsas de pesquisa; ao Dr. Fernando Carneiro Albuquerque (CPATU-EMBRAPA) pelo fornecimento da cultura de *P. splendens*; ao Instituto Biológico pelo uso das câmaras de crescimento; ao Instituto de Botânica que cedeu as instalações da Seção de Micologia e Líquenologia, onde o trabalho foi realizado e ao Dr. Alasdair Burman pela revisão do texto em inglês.

Referências Bibliográficas

1. Aderungboye, F.O. & Esuruoso, O.F. - Control of the blast disease of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) by cultural practices. Nigerian J. Plant Prot., 2:8-14, 1972.
2. Cardoso, J.E. & Albuquerque, F.C. - Podridão radicular e tombamento de plântulas de pimenta do reino causada por *Pythium splendens* Braun. Fitopatologia Brasileira, 4(1):17-24, 1979.
3. Carvalho, Y. - Dinâmica de população de *Pythium splendens* Braun no solo. Instituto de Biociências, São Paulo, USP, 1983 (Tese de Doutoramento).
4. Griffin, D.M. - Ecology of soil fungi. London, Chapman & Hill Ltd. 1972.
5. Hancock, J.C. - Factors affecting soil population of *Pythium ultimum* in the San Joaquin Valley of California. Hilgardia, 45(4):107-122, 1977.
6. Harris, R.F. & Sommers, L.E. - Plate dilution frequency technique for assay of microbial ecology. Applied Microbiology, 16(2):330-334, 1968.
7. Kenerley, C.M. & Bruck, R.I. - Effect of soil temperature on survival of *Phytophthora cinnamomi* in *Abies fraseri* nursery beds. Phytopathology, 71:885 (Abstract), 1981.
8. Klisiewicz, J.M. - Relation of *Pythium* spp to root rot and damping-off of safflower. Phytopathology, 58:1384-1386, 1968.
9. Littrell, R.H. & Mc Carter, S.M. - Effect of soil temperature on virulence of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium myriotylum* to rye and tomato. Phytopathology, 60:704-707, 1970.
10. Lumsden, R.D.; Ayers, W.A. & Dow, R.L. - Differential isolation of *Pythium* species from soil by means of selective media, temperature and pH. Phytopathology, 65:606-612, 1975.
11. Lumsden, R.D.; Ayers, W.A.; Dow, P.B.; Lewis, J.A.; Papavizas, G.C. & Kantzes, J.C. - Ecology and epidemiology of *Pythium* species in field soil. Phytopathology, 66:1203-1209, 1976.
12. Plaats-Niterink, A.J. van der - Monograph of the genus *Pythium*. 1st edit. Studies in Mycology 21, Baarn, Netherlands, CBS. 1981.
13. Pullman, G.S.; De Vay, J.E. & Garber, R.H. - Soil solarization and thermal death: a logarithmic relationships between time and temperature for four soilborne plant pathogens. Phytopathology, 71:959-964, 1981.
14. Rajagopalan, K. - Influence of irrigation and shading on the

- occurrence of blast disease of oil palm seedling. Nigerian Institute for Oil Palm Res., 5(19):23-31, 1974.
15. Rajan, K.M. & Singh, T.S. - Soil physical factors and the population of *Pythium aphanidermatum*. Indian J. Mycology Plant Pathology, 3(1):44-49, 1973.
16. Robertson, G.I. - The genus *Pythium* in New Zealand. New Zealand J. Bot., 18:73-102, 1980.

Recebido para publicação em 18/5/89

ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS FASES FILAMENTOSA E LEVEDURIFORME DE *SCOPULARIOPSIS BREVICAULIS*

Claudete Rodrigues Paula
 Adhemar Purchio
 Walderez Gambale
 Benedito Corrêa

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

& Maria de Fátima Costa Pires

Instituto Adolfo Lutz
 Seção de Micologia
 Av. Dr. Arnaldo, 355
 01245 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Seis culturas de *S. brevicaulis*, em suas fases M e Y, foram estudadas quanto às suas características fisiológicas e de patogenicidade. As provas bioquímicas revelaram que as culturas não produzem amido, não reduzem nitrato a nitrito, não fermentam a dextrose, hidrolizam a uréia, liquefazem a gelatina, reduzem o azul de metíleno, produzem catalase e trimetilarsina. A hidrólise do amido e da caseína determinam diferenças fundamentais entre as duas fases do fungo: provas positivas para a fase M e negativas para a fase Y. A assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas foram semelhantes para a fase Y. Camundongos irradiados e não irradiados, foram inoculados experimentalmente e separadamente com ambas as fases do fungo. Os primeiros animais morreram após 5-10 dias, apresentando à necrópsia quadro hemorrágico difuso e o corte histológico dos órgãos revelou focos de infiltração leucocitária, edema e congestão dos vasos. O segundo grupo, foi sacrificado após 5 semanas e apresentou resultados semelhantes ao primeiro com relação aos cortes histológicos. O fungo, na sua fase Y, foi observado microscopicamente ao exame direto do exudato peritoneal, dentro e fora de macrófagos.

Introdução

Scopulariopsis brevicaulis é um fungo oportunista, dimórfico, o qual é citado cada vez mais na literatura médica humana e veterinária. A este fungo são atribuídos casos de onicomicose; infecções subcutâneas; otomicose; granulomas ulcerativos da pele; formação de bola fúngica; lesões superficiais em bovinos, cães e gatos e quadros de pityriasis rósea em suínos (7, 9, 10, 17, 19, 21, 15, 26). Seu dimorfismo e morfogênese, foram descritos recentemente por Paula & col. (16).

Apesar destes aspectos interessantes, pouco se sabe a respeito das suas características bioquímicas e da patogenicidade, sendo desconhecidos estes dados com relação a fase Y. Algumas peculiaridades bioquímicas já foram descritas, tais como a habilidade de converter arsênico em trimetilarsina; de metilar compostos inorgânicos; de provocar proteólise em proteínas de origem animal e vegetal; de utilizar compostos de nitrogênio, tais como amônia e nitrato (4, 15, 16).

González-Ochoa & Castillo (8), publicaram estudos relativos a

inoculação da fase M em camundongos, descrevendo que 25% dos animais apresentaram manifestações patológicas à necropsia.

Esta pesquisa teve como objetivos o estudo de algumas características bioquímicas das fases miceliana e leveduriforme de *S. brevicaulis*, assim como verificar a patogenicidade destas formas em camundongos, irradiados e não irradiados.

Material e Métodos

Culturas - Foram empregadas seis culturas de *S. brevicaulis* que apresentavam dimorfismo (ICB-I2 n°s 3, 4, 6, 7, 13 - ATCC 62614-e 16).

Manutenção das culturas - As culturas M foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose (Difco), a 25°C, com repiques de 30 dias. As respectivas culturas Y foram mantidas em ágar malte (Oxoid), a 37°C, tensão de 10% de CO₂, com repiques de 7 dias, conforme preconizado por Paula & Col. (16).

Características bioquímicas estudadas
 - Os testes realizados neste trabalho, de modo geral, são clássicos, alguns empregados em bacteriologia e outros no estudo de leveduras, e seguiram metodologia já descrita: produção de compostos extracelulares semelhantes ao amido (11); redução de nitrato a nitrito (1); fermentação alcóolica da dextrose (11); hidrólise da uréia (6); liquefação da gelatina (24); redução do azul de metíleno (13); produção de catalase (1); produção de trimetilarsina (23); hidrólise do amido (24); hidrólise da caseína (24); e prova de assimilação de fontes de carbono e nitrogênio pelas amostras leveduriformes (11). As provas bioquímicas foram realizadas a 25°C e em aerobiose, para a fase miceliana e a 37°C, em aerobiose e tensão de 10% de CO₂ para a fase leveduriforme.

Substâncias empregadas como fontes de carbono e nitrogênio - Foram utilizadas substâncias Merck, P.A., nos testes de assimilação como fontes de carbono e pertencentes ao grupo de ácidos orgânicos, aminoácidos, glicídeos (Tabelas 2 e 4) e polipeptídeos (ácido casamino,

proteose peptona, triptona e peptona). Nitrato de potássio, sulfato de amônia, uréia e peptona foram as substâncias empregadas nos testes áuxanográficos como fontes de nitrogênio.

Animais utilizados para a inoculação experimental e procedimentos - Foram empregados camundongos brancos, machos, adultos (*Mus musculus* var. swiss), com 2 meses de idade e peso médio entre 50-52 gramas. A metade do lote experimental de animais foi submetida à fonte de radiação gama (cobalto), com a potência de 570 Rads, por 3 minutos. Os controles foram feitos com animais irradiados e não irradiados. Foi realizada a inoculação intraperitoneal de 0,5ml de suspensão salina das fases M e Y (escala Mc Farland 3). Os animais que não morreram durante o experimento foram sacrificados após 5 semanas, destinando-se fígado, pâncreas, baço, rins e intestino para o exame histopatológico (Coloração de H.E.). Com os animais que morreram durante o experimento, procedeu-se de igual modo. Foram feitas ainda lavagens da cavidade peritoneal dos animais sacrificados, com solução salina estéril, realizando-se exames à fresco e esfregaços corados pela técnica de Giemsa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Resultados

Provas bioquímicas - Os principais resultados das provas bioquímicas encontram-se sumarizados nas Tabelas de 1 a 4. A fermentação da dextrose, produção de amido extra-celular e redução de nitrato a nitrito foram testes negativos para todas as amostras. A hidrólise da uréia, redução de azul de metíleno, liquefação da gelatina, produção de catalase e trimetilarsina foram provas positivas para todas as culturas. As amostras Y assimilaram todos os polipeptídeos, como fontes de carbono e o sulfato de amônia e uréia como fontes de nitrogênio. Nenhuma amostra assimilou o nitrato de potássio. Não houve discordância de resultados com relação a assimilação em aerobiose e 10% de CO₂.

Tabela 1 - Características bioquímicas diferenciais das amostras de *Scopulariopsis brevicaulis* (fases M - 25°C e aerobiose; fase Y - 37°C, aerobiose e 10% CO₂).

Símbolos: Y = amostras leveduriformes; M = amostras micelianas; - = reação negativa; + = reação positiva; +* = reação fortemente positiva e +** = reação precocemente positiva (24 horas).

Amostras	Hidrólise do amido	Produção de amônia	Hidrólise da caseína	Produção de catalase	Produção de trimetilartrina
Y	-	-	-	-*	+**
M	+	+	+	+	-

Tabela 2 - Aminoácidos assimiláveis como fontes de carbono por amostras leveduriformes de *Scopulariopsis brevicaulis*, no período de 96 horas, a 37°C, aerobiose e 10% CO₂.

Símbolos: + = assimilação; - = não assimilado; +* = fracamente assimilado.

Substâncias	Amostras Leveduriformes					
	3	4	6	7	13	16
D-L-alanina	+	+	+	+	+	-
L-arginina	-	+	+	+	-	-
L-asparagina	+	+	+	+	+	+
L-ácido aspártico	+	+	+	+	-	-
L-cisteína	-	-	+	-	-	-
L-cistina	-	-	-	-	-	-
creatina	-	-	-	+	-	-
creatinina	-	-	-	-	-	-
D-L-fenilalanina	+	+	-	-	-	+*
3-4-dihidróxi-L-fenilalanina	-	-	-	-	-	-
glicocola	+	+*	+*	-	+	+
L-ácido glutâmico	+	+	+	+	-	+
L-histidina	-	-	-	-	-	-
L-isoleucina	+*	+	+*	+	+	+
L-leucina	-	+*	+*	+	+	+*
L-lisina	+	-	+	+	+	+
D-L-metionina	-	-	-	-	-	-
L-ornitina	-	+	+	+	+	+
L-prolina	+	-	+	+	+	+
D-L-serina	+	+	+	+	+	+
L-tirosina	-	-	-	-	-	-
D-L-treonina	+	+	+*	+	+	+
L-triptofano	-	+	+	+	+	+
D-L-valina	+*	-	+*	+*	+	-
Dextrose	+	+	+	+	+	+

Tabela 3 - Ácidos orgânicos assimiláveis como fontes de carbono por amostras leveduriformes de *Scopulariopsis brevicaulis*, no período de 96 horas, a 37°C, aerobiose e 10% CO₂.
Símbolos: + = assimilado; - = não assimilado ;
+* = fracamente assimilado.

Substâncias	Amostras Leveduriformes					
	3	4	6	7	13	16
Ácido cítrico	-	+	+	+	-	-
Ácido cólico	-	-	-	-	-	-
Ácido dehidrocólico	-	-	-	-	-	-
Ácido 2,5 dimetil-benzeno-sulfônico	+	-	+	-	+	++
Ácido esteárico	-	-	-	-	-	-
Ácido ftálico	-	-	-	-	-	-
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-
Ácido ceto-glutárico	+	+	-	-	+	-
Ácido láctico	+	+	+	+	+	+
Ácido laurínico	+	+	-	++	+	+
Ácido D-L-málico	+	++	+	+	+	+
Ácido malônico	-	+	-	-	-	-
Ácido oleico	+	+	+	+	+	+
Ácido oxálico	-	-	-	-	-	-
Ácido palmítico	-	-	-	-	-	-
Ácido pirogálico	-	-	-	-	-	-
Ácido pirúvico	+	+	+	+	+	++
Ácido succínico	-	+	-	-	+	+
Ácido tântico	+	-	+	++	++	-
Ácido tartárico	-	-	-	-	-	-
Dextrose	-	+	+	-	-	+

Inoculação experimental - Entre o 5º e o 10º dia da inoculação ocorreu a morte dos animais irradiados e inoculados, tanto com a fase M como com a fase Y. Estes animais apresentavam abdômen volumoso e, à autópsia, revelaram intestino, fígado, baço, pâncreas e rins hemorrágicos. Havia ainda, algumas vezes, secreção purulenta nos órgãos genitais externos. Ao corte histológico, os órgãos revelaram, em alguns casos, focos de infiltração leucocitária, edema e congestão dos vasos, não se evidenciando qualquer estrutura fungica característica.

O restante do lote dos animais inoculados, e sacrificados ao término da 5ª semana, não apresentou nenhuma anormalidade aparente. Ao corte histológico verificou-se, algumas vezes, focos de infiltração leucocitária e congestão dos vasos. Não se verificou também qualquer estrutura fungica característica, em todos os cortes histológicos examinados.

Os animais controles, irradiados e não irradiados, não morreram durante o

experimento e à autópsia, não apresentaram qualquer anormalidade.

No exame dos esfregaços realizados com o líquido peritoneal dos animais sacrificados, pode-se observar o fungo, em sua fase Y, dentro e fora de macrófagos. Verificou-se que o mesmo foi corado fracamente pelo Giemsa.

Discussão

Características bioquímicas - As características bioquímicas de *S. brevicaulis* foram estudadas, independentemente, em suas fases M e Y. Analisando-se comparativamente as amostras M e Y, observou-se elevado número de provas com resultados semelhantes. Os testes de hidrólise do amido e da caseína são provas bioquímicas diferenciais entre as duas fases (M e Y), evidenciando a presença ou ausência de enzimas próprias de cada um dos representante dos tipos morfológicos.

A habilidade em converter arsênico em trimetilarsina, está presente nas duas fases, sendo esta uma das provas

empregadas para a caracterização de fungos que possuem anelídeos (23). Segundo Paula & Col. (16) estas estruturas estão presentes na fase de transição de *S. brevicaulis* (reversão Y → M), onde as células leveduriformes produziram estruturas semelhantes à anelídeos, comprovando a positividade da reação.

O pequeno número de estudos concernentes ao bioquímismo de *S. brevicaulis* apresentou resultados coincidentes com os do presente trabalho, tal como suas propriedades proteolíticas (15 e 26).

Os testes auxanográficos foram empregados somente para a fase Y, pois não se conseguiu metodologia reproduzível, tanto em meio líquido, como em meio sólido, quando se utilizou as amostras M do referido fungo. Observou-se que as substâncias experimentadas como fontes de carbono e nitrogênio apresentaram resultados bastante homogêneos frente às amostras leveduriformes. Entre os aminoácidos, houve discordância de resultados apenas com a assimilação de L-ácido aspártico, de D-L-fenilalanina, L-leucina e D-L-valina. Os ácidos 2,5 dimetil benzeno-sulfônico, malônico e tânico tiveram assimilação variável. Entre os carboidratos, o dulcitol e a salicina apresentaram resultados variáveis. Convém aqui salientar que a peptona foi assimilada por todas as culturas, quando utilizada tanto como fonte de carbono de nitrogênio. Não se pode obter relação entre comportamento bioquímico e patogenicidade das amostras.

Patogenicidade das amostras M e Y -
Através dos bioensaios com camundongos, constatou-se a morte dos animais irradiados entre o 5º e o 10º dia da inoculação, os quais apresentaram quadros de anormalidade macroscópica em vários órgãos, assim como, em alguns casos, secreção purulenta nos órgãos genitais externos. Após 5 semanas da inoculação, os animais sacrificados não apresentaram anormalidades aparentes nas vísceras.

Tanto nos cortes histológicos das vísceras dos animais irradiados como nos não irradiados verificou-se a ausência de estruturas fúngicas e, algumas vezes, focos de infiltração

Tabela 4 - Glicídeos assimiláveis como fontes de carbono por amostras leveduriformes de *Scopulariopsis brevicaulis*, no período de 96 horas, a 37°C, aerobiose e 10% CO₂.

Símbolos: + = assimilado; - = não assimilado; +* = fracamente assimilado

Substâncias	AMOSTRAS LEVEDURIFORMES					
	3	4	6	7	13	16
Amido	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	+	-	-	-	-
Eritritol	-	+	-	-	-	-
Galactose	-	+	+	+	+	+
Inositol	-	+*	-	+	+	+
Inulina	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-
Manose	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Melizitose	-	+	+	+	+	+
Rafinose	-	-	-	-	-	-
Ramnose	-	-	-	-	-	-
Ribitol	-	-	-	-	-	-
Ribose	-	+	+	+	+	+
Sacarose	-	+	+	+	+	+
Salicina	-	-	+	+	-	+
Sorbose	-	-	-	-	-	-
Trealose	+*	+	+	+	+	+
Xilose	+	+	+	+	+	+
Dextrose	+	+	+	+	+	+

leucocitária, edema e congestão dos vasos.

Ressalta-se ainda a presença de *S. brevicaulis*, no líquido peritoneal dos animais sacrificados.

Outro aspecto importante observado foi a transformação M-Y ocorrida in vivo. Observou-se a presença do fungo, no exudato peritoneal e na sua fase Y, dentro e fora de macrófagos. Convém salientar que esta transformação M-Y in vivo ocorre, geralmente, com os fungos patogênicos dimórficos (12).

A morte dos animais inoculados, as alterações morfológicas e quadros hemorrágicos observados em diversas vísceras, podem ser explicados pela produção in vivo de metabólito tóxico que exerceu atividade fulminante nos animais irradiados, mais suscetíveis. A sintomatologia apresentada por estes camundongos assemelhou-se às principais manifestações de micotoxicoses em animais, isto é, nefropatias, perturbações renais,

alterações intestinais, hemorragias hepáticas e esplênicas e, às vezes, secreções purulentas ou sanguinolentas nos órgãos genitais externos (14, 18, 20 e 22).

Pesquisas tem demonstrado que os animais e o próprio homem exibem diferentes graus de sensibilidade às várias micotoxinas, segundo alguns fatores como idade, estado de saúde, grau de exposição e quantidade de toxina produzida pelo fungo (3). Christensen & Col. (5) assinalaram que *S. brevicaulis* produz composto tóxico que pode ser letal para ratos, em 7 dias, quando estes animais são alimentados com ração contaminada pelo referido fungo. As manifestações clínicas mais comuns nos animais foram hemorragias, principalmente, do trato gastrointestinal, hemoglobinuria e distúrbios do sistema nervoso central. Por sua vez, Blank & Col. (2), verificaram que extratos lipídicos de *S. brevicaulis* tinham atividade carcinogênica para camundongos produzindo sarcomas subcutâneos, leucemia e, principalmente, tumores pulmonares.

Purchio & Col. (19) verificaram a presença de *S. brevicaulis* somente na porção superficial de crostas obtidas de caso de pityriasis rósea de suínos, não tendo observado a presença do mesmo na epiderme ou na derme inflamada, discutindo a possibilidade da presença de uma toxina produzida in vivo pelo fungo.

Pelos dados obtidos e informações da literatura, reforça-se a possibilidade da atuação de uma micotoxina produzida por *S. brevicaulis* que seria igualmente responsável pelo sugestivo quadro hemorrágico obtido nos animais de experimentação.

Summary

Yeast and mould strains of *S. brevicaulis* were studied for analysis of the biochemical characteristics and pathogenicity. We utilized six strains, that presented dimorphism. In this investigation all strains presented negative results for: starch-like compounds; nitrate to nitrite reduction and fermentation of dextrose. Urea hydrolysis, gelatin liquefaction, methylene-blue reduction,

production of catalysis and arsenic reaction were positive tests for all strains. Meanwhile, casein and starch hydrolysis were the differential biochemical characteristics between the mould and yeast phases (positive for M phase and negative for Y phase). The experimental inoculation of the both phases in mice, irradiated and not irradiated, results in a death of the first group of animals, that presented a diffuse hemorrhagic picture. Similar results were findings with the second group of animals, that were killed after five weeks of the inoculation. *S. brevicaulis* presence was revealed in the peritoneal exudates, inside and out macrophages.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. Romeu Macruz, anátoro-patologista do Instituto Biológico e do "Jockey Club" de São Paulo, pela realização e análise dos cortes histológicos e ao Dr. Wagner Barbieri pela valiosa colaboração na execução do trabalho.

Referências Bibliográficas

- 1.Bier, O. - Bacteriologia e imunologia, em suas aplicações à Medicina e à higiene. 16ed. rev., São Paulo, Melhoramentos - EDUSP, 1975.
- 2.Blank, F.; Chin, O.; Just, G.; Meranze, D.R.; Shimkin, M.B.; Wieder, R. - Carcinogens from fungi pathogenic for man. Cancer Res., 28:2276-81, 1968.
- 3.Butler, W.H. & Barnes, J.M. - Toxic effect of groundnut meal containing aflatoxin to rats and guinea pigs. Brit. J. Cancer, 17:699-710, 1973.
- 4.Challenger, F. - Biological methylation. Adv. Enzymol., 12:429-91, 1951.
- 5.Christensen, C.M.; Nelson, G.H.; Mirocha, C.J.; Bates, F. - Toxicity experimental animals of 934 isolates of fungi. Cancer Res., 28:2293-95, 1968.
- 6.Difco Laboratories. Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. 9ed., Detroit, 1974.

7. Emmons, C.; Binford, C.H.; Utz, Y.P. - Medical Mycology. 2ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1970.
8. González-Ochoa, A. & Castillo, E.D. - Frecuencia de *S. brevicaulis* en muestras de suelos en Curvas y minas del país. Rev. Inst. Salubr. Enferm. Trop., 20:247-52, 1960.
9. Kintner, L.D. & Blenden, D.C. - Mycotic dermatitis in a steer. JAMA, 138:9-12, 1961.
10. Larsh, H.W. - Opportunistic fungi in chronic disease other than cancer and related problems. In: International Society for human and animal Mycology. Recent advances in medical and veterinary mycology: Proceedings of the 6. Congress of the ISHAM, Tokyo 1975; Iwata, Baltimore University Park Press, 1977. p.221-9.
11. Lodder, J. - The yeasts: a taxonomic study. 2ed. Amsterdam, Elsevier, 1970.
12. McGinnis, M. - Laboratory handbook of medical mycology. New York, Academic Press, 1980.
13. Minami, P.S. - Contribuição para o estudo da atividade bioquímica de *P. brasiliensis*. São Paulo, 1968. (Tese de Doutoramento, Faculdade de Medicina da USP).
14. Mirocha, G.J. & Christensen, C.M. - Fungi Metabolites toxic to animals. Ann. Rev. Phytopathol., 12:303-29, 1976.
15. Morton, F.J. & Smith, G. - The genera *Scopulariopsis* Bainier, *Microascus* Zukal and *Doratomyces* Corda. Kew, Commonwealth Mycological Institute, 1963 (Mycological Papers nº 86).
16. Paula, C.R.; Purchio, A.; Gambale, W. & Corrêa, B. - Dimorphism of *S. brevicaulis*: Morphogenesis of mould to yeast phase. Mycopathologia, 100:69-74, 1987.
17. Paula, C.R.; Costa, E.O.; Pires, M.F.C.; Coutinho, S.D.; Carvalho, V.M.; Castillo, W.; Moral, M.S. - *Scopulariopsis brevicaulis*: agente etiológico de dermatose em cães e equinos. Rev. Soc. Microbiol., 18(4):366-370, 1987b.
18. Petit, R.E. & Taber, A.R. - Symposium on mycotoxicology: food and feed contamination. Proc. Am. Phytopathol. Soc., 3:99-125, 1976.
19. Purchio, A.; Machado, A.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Mariano, M. - *S. brevicaulis* a possible etiologic agent of pityriasis rosea in piglets. In: International Conference on the mycoses, 5º: Proceedings Washington, OPAS, 1980. p.104-11 (Scientific Publications nº 396).
20. Romer, T.R. - Analytical approaches to the trichotecenes mycotoxins. Cereal Foods World, 22:520-3, 1977.
21. Sekhon, A.S. & Williams, D.J. - Deep scopolatiopsis: a case and sensitivity studies. Abs. Annu. Meet. Soc. Microbiol., 74:Mm-18, 1974.
22. Shoutwell, O.L. - Mycotoxins in corn: related problems. Cereal Foods World, 22:527-27, 1977.
23. Tubaki, K. - Annelation in fungi and the arsenic reaction. In: International Society for human and animal mycology. Recent advances in medical and veterinary mycology: Proceedings of the 6. Congress of the ISHAM, Tokyo 1975; Ed. K. Iwata, Baltimore, University Press, 1977, p.277-82.
24. Waksman, S.A. - The actinomycetes: classification, identification and descriptions of genera and species. Baltimore, Williams and Wilkins, 1961.
25. Welfringer, A. & Percebois, G. - Données sur l'onyxis à *S. brevicaulis*. Ann. Med. Nancy, 15:213-8, 1976.
26. Zaror, L.; Frick, P.; Moreno, M.I. - Micosis ungueal por *S. brevicaulis*. Rev. Arg. Micol., 5:12-5, 1982.

Recebido para publicação em 20/05/89

ATIVIDADE DE ANTI-SÉPTICOS CONTRA LEVEDURAS ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES COM CÂNCER DE BOCA ANTES E DURANTE A RADIOTERAPIA

Arlete Emily Cury

Faculdade de Ciências Farmacêuticas USP
Deptº de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Av. Prof. Lineu Prestes, 580
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP, Brasil

Maria Carmeli C. Sampaio
Esther Goldenberg Birman

Faculdade de Odontologia USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 2217
Cidade Universitária
05508 São Paulo SP, Brasil

& Claudete Rodrigues Paula

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

Resumo

Foi estudada, "in vitro", a atividade antifúngica de cinco anti-sépticos contra leveduras isoladas antes e durante a radioterapia de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de boca. A concentração inibitória mínima do triclosan variou de $\leq 0,07$ g/L a $20 > g/L$, conforme a cepa estudada, enquanto que a dos outros anti-sépticos foi invariavelmente $\leq 0,07$ g/L. O hexaclorofeno e o timerosal foram fungicidas também em concentrações $\leq 0,7$ g/L para todas as leveduras avaliadas, e o cloreto de cetilpiridino o foi a 0,31 g/L. Em concentrações de até 20 g/L, o triclosan não demonstrou atividade fungicida contra a maior parte das leveduras, e a violeta de genciana não foi letal somente para duas cepas de *C. albicans* isoladas de pacientes que se encontravam sob radioterapia.

Introdução

Pacientes portadores de doenças debilitantes, como o câncer, frequentemente adquirem infecções por diversos microrganismos. O comprometimento imunológico causado pela doença, representa o principal fator que predispõe o paciente às infecções, porém, o efeito imunodepressor de tratamentos antineoplásicos, bem como a carência

nutricional, também contribuem, determinando, muitas vezes, exacerbão de um processo infeccioso. Quanto mais se administram potentes drogas antibacterianas para combater as infecções, maior número de microrganismos diferentes de bactérias tornam-se importantes patógenos. Atualmente, as superinfecções são consideradas como uma das principais causas de morbidez e mortalidade entre os pacientes com câncer e

etiologicamente têm sido associadas, com maior frequência, às leveduras. Esta questão deve ser considerada, de modo particular, em pacientes com câncer de boca, cujas lesões usualmente se associam e confundem com as produzidas por levedurosos. A partir destas infecções, aparentemente inocuas, o microrganismo tem a capacidade de produzir infecções fulminantes por disseminação hematogênica (1).

Embora diversos antifúngicos sejam atualmente indicados no tratamento de levedurosos orais, a comprovação da ocorrência de cepas resistentes a estes quimioterápicos tem servido de alerta contra o uso indiscriminado dos mesmos (1, 4, 5, 8, 9). Neste sentido, a aplicação de outros agentes, como os anti-sépticos, que se tornou secundária com o advento daqueles quimioterápicos (1, 6), merece ser reconsiderada, ao menos como uma medida alternativa ou complementar, no tratamento. Existem, porém, poucos trabalhos objetivados a avaliar a atividade antifúngica dos anti-sépticos contra leveduras isoladas de material biológico (2, 3, 6). Assim, este estudo foi realizado com a finalidade de comprovar, "in vitro", a ocorrência de tal atividade contra leveduras isoladas, antes e durante radioterapia, da cavidade oral de pacientes com câncer de boca.

Material e Métodos

Microrganismos - As leveduras em estudo foram isoladas e identificadas segundo protocolo descrito por Sampaio (10) e encontram-se listadas nas Tabelas de 1 a 6. As amostras de *Candida albicans* foram classificadas como pertencentes ao sorotipo A.

Drogas - Foram avaliadas as atividades antifúngicas do cloreto de cetilpiridino, hexaclorofeno, timerosal, triclosan e da violeta de genciada, adquiridos no comércio sob a forma de pó.

Atividade antifúngica - Este estudo foi realizado mediante a execução de testes para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), como anteriormente descrito (2). Em

Tabela 1 - Atividade antifúngica do cloreto de cetilpiridino contra leveduras isoladas de pacientes com câncer de boca.

Levedura (nº de isolados)	Teste de sensibilidade	% acumulado de amostras sensíveis à concentração (g/L) de:		
		≤ 0,07	0,15	0,31
<i>Candida albicans</i> (9)	CIM	100		
	CFM	55,5	66,6	100
<i>Candida tropicalis</i> (3)	CIM	100		
	CFM	66,6	66,6	100
<i>Pichia farinosa</i> (1)	CIM	100		
	CFM	100		
<i>Rhodotorula glutinis</i> (1)	CIM	100		
	CFM	100		

Tabela 2 - Atividade antifúngica do cloreto de cetilpiridino contra leveduras isoladas, durante a radioterapia, de pacientes com câncer de boca.

Levedura (nº de isolados)	Teste de sensibilidade	% acumulado de amostras sensíveis à (g/L) de:		
		≤ 0,07	0,15	0,31
<i>Candida albicans</i> (13)	CIM	100		
	CFM	53,8	92,2	100
<i>Candida parapsilosis</i> (1)	CIM	100		
	CFM	100		
<i>Candida kefyr</i> (1)	CIM	100		
	CFM	100		
<i>Candida tropicalis</i> (2)	CIM	100		
	CFM	100		
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	CIM	100		
	CFM	0		100
<i>Pichia farinosa</i> (1)	CIM	100		
	CFM	100		
<i>Rhodotorula rubra</i> (2)	CIM	100		
	CFM	100		
<i>Torulopsis holmiae</i> (1)	CIM	100		
	CFM	100		

resumo, para avaliação da CIM as amostras foram submetidas a concentrações variáveis (0,07 a 20 g/L) do anti-séptico, em ágar Sabouraud dextrose (ASD), e a leitura do teste foi realizada após crescimento dos controles (cerca de 24 horas a 30°C) em meio sem droga. Em seguida, procedeu-se ao teste de avaliação da concentração fungicida mínima (CFM) de cada agente, subcultivando-se, em ASD, as amostras que no teste anterior mostraram inibição do crescimento e os controles, e procedendo-se à leitura do teste após 48 horas de incubação a 30° C.

Resultados

Alguns dos resultados dos testes de sensibilidade encontram-se nas Tabelas

Tabela 3 - Atividade antifúngica do triclosan contra leveduras isoladas de pacientes com câncer de boca.

Levedura (nº de isolados)	Teste de sensibilidade	% acumulado de amostras sensíveis à concentração (g/L) de:						
		0,07	0,15	0,31	0,62	1,2	2,5	5
<i>Candida albicans</i> (9)	CIM	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	11,1	100
	CFM	0	0	0	0	0	0	33,3
<i>Candida tropicalis</i> (3)	CIM	33,3	33,3	33,3	33,3	100		
	CFM	0	0	0	33,3	33,3	33,3	100
<i>Pichia farinosa</i> (1)	CIM	0	0	100				
	CFM	0	0	0	0	0	0	100
<i>Rhodotorula glutinis</i> (1)	CIM	0	0	0	100			
	CFM	0	0	0	0	0	0	100

Tabela 4 - Atividade antifúngica do triclosan contra leveduras isoladas, durante a radioterapia, de pacientes com câncer.

Levedura (nº de isolados)	Teste de sensibilidade	% acumulado de amostras sensíveis à concentração (g/L) de:						
		0,07	0,15	0,30	0,62	1,2	2,5	5
<i>Candida albicans</i> (8)	CIM	0	0	15,4	15,4	15,4	15,4	100
	CFM	0	0	0	0	0	0	38,4
<i>Candida parapsilosis</i> (1)	CIM	100						
	CFM	0	0	0	0	0	0	0
<i>Candida kefyr</i> (1)	CIM	0	100					
	CFM	0	0	0	0	0	0	100
<i>Candida tropicalis</i> (2)	CIM	0	0	0	0	100		
	CFM	0	0	0	0	0	0	100
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	CIM	0	100					
	CFM	0	0	0	0	0	0	100
<i>Pichia farinosa</i> (1)	CIM	0	0	0	0	100		
	CFM	0	0	0	0	0	0	100
<i>Rhodotorula rubra</i> (2)	CIM	100						
	CFM	0	0	0	0	0	0	100
<i>Torulopsis holmiae</i> (1)	CIM	0	0	0	100			
	CFM	0	0	0	0	0	0	100

Tabela 5 - Atividade antifúngica da violeta de genciana contra leveduras isoladas de pacientes com câncer de boca.

Levedura (nº de isolados)	Teste de sensibilidade	% acumulado de amostras sensíveis à concentração (g/L) de:				
		≤ 0,07	0,15	0,31	0,62	1,2
<i>Candida albicans</i> (9)	CIM	100				
	CFM	55,6	66,6	77,7	100	
<i>Candida tropicalis</i> (3)	CIM	100				
	CFM	33,3	33,3	66,6	66,6	100
<i>Pichia farinosa</i> (1)	CIM	100				
	CFM	0	0	0	0	100
<i>Rhodotorula glutinis</i> (1)	CIM	100				
	CFM	0	0	0	100	

Tabela 6 - Atividade antifúngica da violeta de genciana contra leveduras isoladas durante a radioterapia, de pacientes com câncer.

Levedura (nº de isolados)	Teste de sensibili-dade	% acumulada de amostras sensíveis à (g/L) de:								concentração			
		≤ 0,07	0,15	0,31	0,62	1,2	2,5	5	10	20	> 20		
<i>Candida albicans</i> (13)	CIM	100											
	CFM	23	23	53	68,3	83,6	83,6	83,6	83,6	83,6	83,6	100	
<i>Candida parapsilosis</i> (1)	CIM	100											
	CFM	0	0	0	0	0							
<i>Candida kefyr</i> (1)	CIM	100											
	CFM	0	0	100									
<i>Candida tropicalis</i> (2)	CIM	100											
	CFM	0	0	50	50	100							
<i>Geotrichum candidum</i> (1)	CIM	100											
	CFM	100											
<i>Pichia farinosa</i> (1)	CIM	100											
	CFM	0	0	0	0	0	0	0	0	100			
<i>Rhodotorula rubra</i> (2)	CIM	100											
	CFM	0	0	0	50	50	100						
<i>Torulopsis holmiae</i> (1)	CIM	100											
	CFM	0	0	100									

1 a 6. Para qualquer das amostras isoladas, as CIMs dos anti-sépticos foram $\leq 0,07$ g/L, excetuando-se as do triclosan. Este apresentou CIMs variáveis de 0,07 a > 20 g/L, conforme a levedura em estudo (Tabelas 3 e 4).

O hexaclorofeno e o timerosal mostraram atividade fungicida também em baixas concentrações, agindo contra todas as leveduras em CFMs $\leq 0,07$ g/L. Nestas concentrações, o cloreto de cetilpiridino foi letal para 66,6% das leveduras avaliadas e a 0,31 g/L o foi para 100% (Tabelas 1 e 2). Por outro lado, em concentrações de até 20 g/L, o triclosan foi incapaz de exercer ação fungicida contra a maioria das amostras em estudo (Tabelas 3 e 4) e a violeta de genciana contra as cepas de *C. albicans* isoladas de dois pacientes submetidos à radioterapia (Tabela 6). As amostras dessa espécie, isoladas dos mesmos pacientes antes do tratamento antineoplásico, mostraram-se sensíveis à concentrações $\leq 0,07$ g/L da violeta de genciana.

Discussão

Concordando com achados anteriores (2), neste trabalho o hexaclorofeno e o timerosal mostraram-se potencialmente ativos contra as leveduras avaliadas. Entretanto, em vista dos efeitos secundários, o primeiro agente encontra-se

praticamente em desuso e o segundo tem aplicação limitada. Por outro lado, triclosan, utilizado em alguns produtos, em substituição ao hexaclorofeno, apresentou atividade antifúngica inferior a dos demais anti-sépticos, em concentrações similares às indicadas para preparações farmacêuticas (6, 7). Nestas condições, o cloreto de cetilpiridino agiu como antifúngico eficaz, superando a violeta de genciana quanto a atividade fungicida.

Considerando-se a procedência das amostras e as concentrações de cada anti-séptico em produtos medicinais (6, 7), foi possível verificar que, com exceção do comportamento observado para algumas amostras de *C. albicans* em relação à violeta de genciana, não ocorreram grandes divergências entre os resultados de sensibilidade das leveduras isoladas, a partir dos mesmos pacientes, antes e durante a radioterapia.

A aplicação tópica de um anti-séptico pode ser altamente desejável quando se considera que uma droga de atividade germicida de amplo espectro raramente determina o aparecimento de superinfecções. Entretanto, os anti-sépticos não são totalmente deprovvidos de toxicidade e, como ocorre com alguns antimicrobianos, podem determinar a emergência de cepas resistentes (1, 3, 6). Assim, só devem ser indicados por profissionais que conheçam suas vantagens e limitações, principalmente quando se requer uso prolongado, como ocorre com pacientes imunocomprometidos. Por outro lado,

essas drogas ainda devem ser mais amplamente estudadas, sob o ponto de vista clínico-laboratorial, quanto ao seu espectro de ação germicida, uma vez que os relatos atualmente disponíveis são insuficientes para evitar que, em muitos casos, sua aplicação seja empírica.

Summary

The antifungal activity of five antiseptics against yeasts was studied "in vitro". The strains were isolated from patients with epidermoid carcinoma of the mouth, before and during radiotherapy. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the triclosan varied with studied strains from $\leq 0,07$ g/L to > 20 g/L, while the MICs of the other antisepsics were $\leq 0,07$ g/L. Hexachlorophene and thimerosal acted as fungicides in concentrations $\leq 0,07$ for all studied strains, and the cetilpyrydinium chloride was fungicide at 0,31 g/L. Triclosan presented no fungicidal activity against the majority of the yeasts in concentrations up to 20 g/L and the gentian violet, in the same concentrations, against two strains of *Candida albicans* isolated from patients submitted to radiotherapy.

Referências Bibliográficas

6. Gilman, A.G.; Goodman, L.S.; Rail, T.W. & Murad, F. - The pharmacological basis of therapeutics. 7ed. New York, Macmillan, 1985.
7. Litter, M. - Farmacologia. 3 ed. Buenos Aires, Ateneo, 1964.
8. Qadri, S.M.H.H.; Flournoy, D.Y.; Qadri, S.G.M. & Ramirez, E.G. - Susceptibility of clinical isolates of yeasts to anti-fungal agents. Mycopathologia, 95:183-187, 1986.
9. Ryley, J.F.; Wilson, R.G. & Barrett-Bee, K.J. - Azole resistance in *Candida albicans*. Sabouraudia, 22:53-63, 1984.
10. Sampaio, M.C.C. - Aspectos clínicos da mucosa bucal de pacientes com carcinoma epidermóide de boca. Sua correlação com a microbiota fúngica e sorotipos de *Candida albicans* antes e durante a radioterapia. São Paulo, 1986. (Tese - Doutoramento - Faculdade de Odontologia da USP).

Recebido para publicação 1/06/89

1. Bodey, G.P. (ed) - Proceedings of a symposium: Candidiasis: a growing concern. Amer. J. Med., 77 (Suppl. 4D), 1-48, 1984.
2. Cury, A.E. - Atividade "in vitro" de alguns anti-sépticos sobre *Candida*. Rev. Microbiol. (São Paulo), 17:137-142, 1986.
3. Cury, A.E.; Minami, P.S. & Parra, D.S. - Sensibilidade "in vitro" de leveduras do gênero *Candida* à violeta de genciana. Rev. Microbiol. (São Paulo), 8:84-88, 1977.
4. Dick, J.D.; Merz, W.G. & Saral, R. - Incidence of polyene-resistant yeasts recovered from clinical specimens. Antimicrob. Agents Chemoth., 18:158-163, 1980.
5. Fisher, J.F. & Henson, D.M. - Amphotericin B resistance in *Candida*. Ann. Intern. Med., 102(4):563-564, 1985.

EUMICOTIC MYCETOMA: REPORT OF A CASE CAUSED BY *MADURELLA GRISEA*

E. Arruda Neto
 A. C. C. Pignatari
 A. Castelo Filho
 A. L. Colombo
 J. C. Longo

Disciplina de Doenças Infecciosas e
 Parasitárias
 Escola Paulista de Medicina
 Rua Botucatu, 862 8º andar
 04023 São Paulo SP, Brasil

& Z. P. Camargo

Disciplina de Micologia
 Escola Paulista de Medicina
 Rua Botucatu, 862 8º andar
 04023 São Paulo SP, Brasil

Resumo

*Micotoma eumicótico: Relato de um caso por *Madurella grisea**

É relatado um caso de micetoma no pé de um agricultor, produzindo grãos negros, cujo agente etiológico foi identificado como sendo *Madurella grisea*. Este é o quarto caso registrado no Brasil. Os autores discutem a distribuição mundial de micetoma por *Madurella grisea*.

Introduction

Mycetoma is a clinical syndrome of localized, indolent, deforming, swollen lesions and sinuses, involving cutaneous and subcutaneous tissues, fascia and bone. The lesions are composed of suppurating abscesses; granulomata and draining sinuses, with the presence of "grains" which are characteristic granules of the etiologic agent. According to the causal agent, mycetoma can be divided into actinomycetomas, caused by actinomycetes, and eumycetomas, caused by true fungi. Some authors apply the term botriomycetoma when agents are bacteria other than actinomycetes (12).

Cases of black grain mycetoma caused by *Madurella grisea* were published 41 times in the world literature (1, 3, 7, 14) (Figure 1), being 3 times in Brazil (3, 5, 6). We report the fourth

case in Brazil, diagnosed by histopathology and culture.

Case Report

A 63-years-old black farmer from a rural area of Bahia state in Brazil was referred for investigation in our service in June, 1985. He had a two-years history of painful swelling of the left ankle, without any skin lesion. Nine months later, after sprain of the same ankle, he felt worse and anti-inflammatory drug was started. He continued with pain, swelling and limitation of foot movements. Seven months later a biopsy of tarsal bone was taken and showed fungi, without identification. Treatment with ketoconazole was started, without improvement. As the swelling and pain continued to worse, the patient was referred to us. Past

Figure 1 - World distribution of Mycetoma by *M. grisea*.

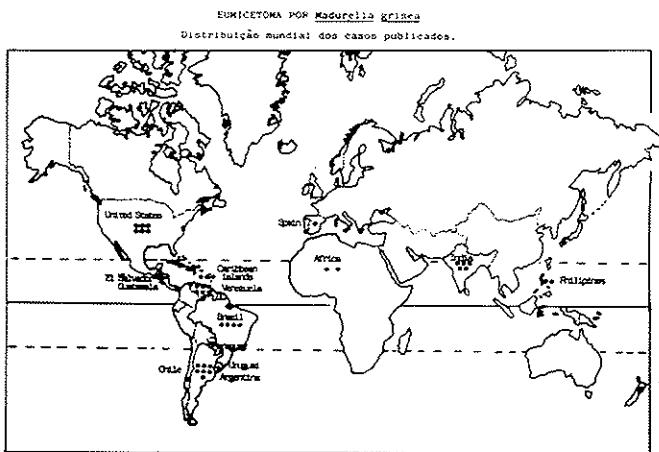


Figure 2 - Mycetoma of the foot caused by *M. grisea*.

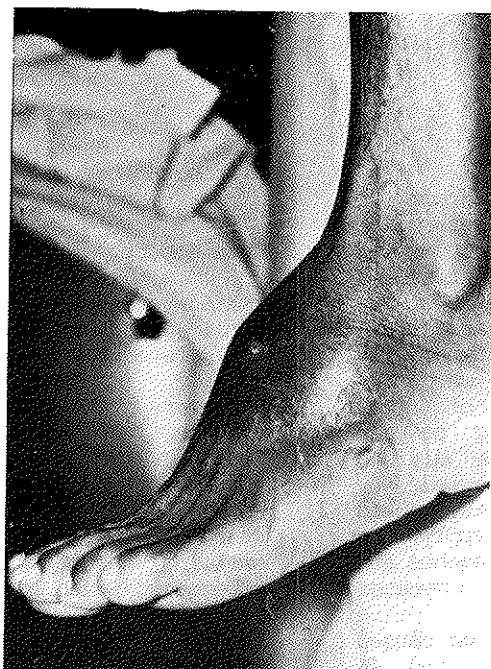


Figure 3 - Osseous lesions by *M. grisea*.



Figure 4 - *Madurella grisea* grains (PAS x 1000).

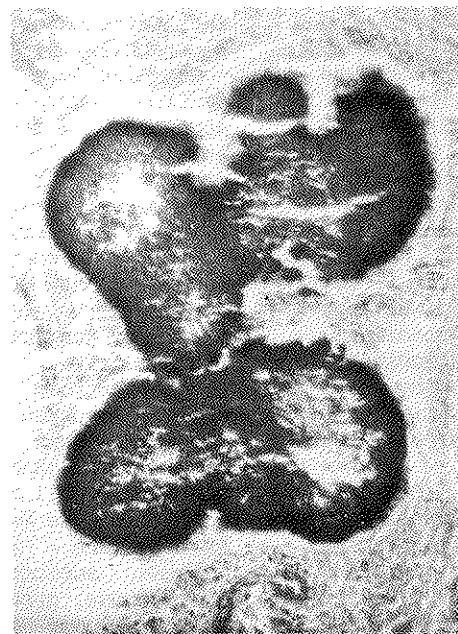
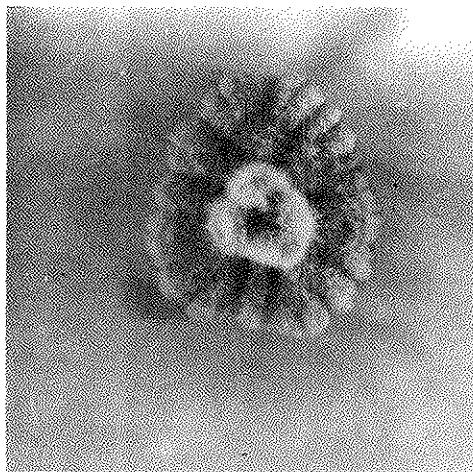


Figure 5 - *Madurella grisea*. Giant colony
Sabouraud glucose agar, aged 14 days.
Magnification: x3,4.



medical history and review of systems were unremarkable. He reported no penetrating trauma.

Physical examination showed a diffuse hard swelling at the medial side of the left ankle, extending to foot dorsal area (Figure 2). The overlying skin was tepid, thick and adherent, without sinuses or fistules. Only a little fluctuant dot was palpable. Limitation of movements of the ankle was observed. Examination of other systems was normal.

Routine laboratory investigation including blood count, urinalyses, blood chemistry, blood clotting and liver function tests were normal. X-ray films of the left foot demonstrated soft tissues swelling, diffuse osteoporosis and osteolysis, sometimes surrounded by osteoblastic zones (Figure 3), narrowing and sclerosis talusnavicular joint and osteoporosis of distal extremity of tibia.

Surgical biopsy of bone and soft tissues were performed, as well as a needle puncture in that fluctuating area. Pus was bloody and contained minute dark granules, about 1mm in diameter. Microscopically, in KOH mounts, the granules were black and lobed and showed dematiaceous, septate

hyphae elements. In biopsy specimens, prepared by routine methods and stained with periodic acid-Schiff (PAS), the centre of the grain appeared hollow with hialine mycelium and the periphery was full of compact mycelium. Cellular inflammatory infiltrate consisted of lymphocytes and neutrophils (Figure 4).

Granules were cultured on Sabouraud dextrose agar at 25°C. The colonies appeared in 7 days, moderately slow and attained a diameter of 13mm after 14 days. The colonies were initially leathery, tan-gray and later downy (Figure 5). Sets of the culture were subcultured on Sabouraud's medium, incubated at 30°C and 37°C and after two weeks they had 13mm and 5mm in diameter, respectively. Subcultures on Brain-heart, Corn-meal, Potato-dextrose and Lactrimel agars showed colonies black to gray and olivaceous-gray and slow growing. Microscopic examination showed only sterile mycelium. Our isolate was identified as *Madurella grisea* by its ability to assimilate glucose, maltose, sucrose and galactose, but not lactose, growing better at 30°C.

Other biopsy was taken in tibial distal extremity, that was positive for the same fungi.

The patient was treated with amphotericin B (2.0g) plus dapsone (100mg/days), without improvement. He persisted with edema and stopped walking because of pain. Amputation was performed at the distal third of the tibia.

Discussion

Mackinnon (8) described *Madurella grisea* as a new species in 1949, from cases of black grain mycetoma originating from Argentina, Chile, Paraguay and Venezuela. Up to the present time, over 41 cases of mycetoma due to *Madurella grisea* had been described in the world literature, being 3 cases related in Brazil by Lacaz's group (3, 5, 6). Two cases were from the northeast and one from the southeast of the country. In the present case, the patient came from the northeast. We are aware of one additional case in Brazil that has not been described in the literature (Dr. O. Fischman, personal communication).

Mariat (11) made a worldwide survey through a big inquest in 1963, obtaining data of 28 cases of mycetoma by *Madurella grisea*, being 19 in Venezuela, 4 in Argentina, 2 in U.S.A., 1 in Madagascar, 1 in Congo-Leopoldville and 1 in Brazil. Surely many of these cases informed to Mariat coincide with publications made by the authors. This fact is useful to stress that published cases do not reflect the actual importance of the disease.

Hay and Mackenzie (2), surveying 44 cases of mycetoma diagnosed in the United Kingdom between 1963 and 1981, found 3 cases caused by *Madurella grisea*, being 2 from Jamaica and 1 from subcontinent India.

There are very few reports of success medical treatment of eumycetomas. Many authors relate the ineffectiveness of various treatment regimens (15). Exception is made to Neuhauser (13), that reported clinical improvement in a case of *M. grisea* mycetoma using dapsona. Amphotericin B has been recommended in those cases in which other treatment have failed, but amputation remains as the final form of treatment in many of these

cases (9, 10).

Summary

A case of black grain podal mycetoma in a Brazilian farmer is reported, in which cultures yielded *Madurella grisea*. This is the fourth case registered in Brazil. The authors discuss the world distribution of mycetoma by *Madurella grisea*.

References

1. Gil, M.R.E.; Lopez, M.A.; Martinez, P.P. & Canales, G. - Un caso de maduromicosis por *Madurella grisea*. Estudio de la cepa. Act. dermo-sifiliogr., 72:263-270, 1981.
2. Hay, R.J. & Mackenzie, D.W.R. - Mycetoma (madura foot) in the United Kingdom - a survey of forty-four cases. Clin. exp. Dermatol., 8:553-562, 1983.
3. Heins-Vaccari, E.M.; Takahashi, N.; Oliveira, N.R.B.; Lacaz, C.S. & Porto, E. - Eumicetoma de grãos pretos, por *Madurella grisea*. Registro de um caso. Rev. Inst. Med. Trop., São Paulo, 24:116-123, 1982.
4. Lacaz, C.S. - Distribuição geográfica dos micetomas no Brasil. An. Bras. Derm., 56:167-172, 1981.
5. Lacaz, C.S. & Netto, C.F. - Contribuição para o estudo dos agentes etiológicos da maduromicose. Folia clin. biol., 21:331-352, 1954.
6. Lacaz, C.S. & Belfort, E.A. - Maduromicose podal de grãos pretos, por *Madurella grisea*. Hospital, 60:367-374, 1961.
7. Mackinnon, J.E. - Agentes de maduromicosis en la region neotropical. An. Fac. Med. Montevideo, 48:453-458, 1963.
8. Mackinnon, J.E.; Ferrada-Urzúa, L.V. & Montemayor, L. - *Madurella grisea* n. sp. A new species of fungus producing the black variety of maduromicosis in South America. Mycopathologia, 4:384-392, 1949.
9. Magana, M. - Mycetoma. Int. J. Dermatol., 23:221-236, 1984.
10. Mahgoub, E.S. - Medical management of mycetoma. Bull. Wld. Hlth. Org., 54:303-310, 1976.

11. Mariat, F. - Sur la distribution géographique et la répartition des agents de mycétomes. Bull. Soc. Path. exot., 56:35-45, 1963.
12. Mollica, P.W.; Brenner, M.A.; Nair, S.R.; Russo, C.L. & Marquit, H. - Madura Foot: A case Report. Cutis, 27:634-635, 1981.
13. Neuhauser, I. - Black grain maduromycosis caused by *Madurella grisei*. Arch. Derm., 72:550-555, 1955.
- 4 Viñó, F.L. - Mycetoma podal maduromicosico a granos negros. Pren. méd. argent., 45:593-599, 1958.
15. Palestine, R.F. & Rogers R.S. - Diagnosis and treatment of mycetoma. J. Amer. Acad. Dermatol., 6:107-111, 1982.

Recebido para publicação em 31/7/89

ISOLATION, REGENERATION AND NUCLEAR CONDITION IN PROTOPLASTS OF A CELLULOLYTIC STRAIN OF *ASPERGILLUS NIGER*

Gustavo Henrique Goldman
 Marisa Vieira Queiroz
 Cláudio Costa
 & João Lúcio de Azevedo

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

Resumo

Isolamento, regeneração e condição nuclear em protoplastos de uma linhagem celulolítica de Aspergillus niger

Foi desenvolvido um processo eficiente para o isolamento de protoplastos e sua regeneração em uma linhagem celulolítica de *Aspergillus niger*. Observações citológicas foram feitas nos protoplastos obtidos tanto a partir de micélio quanto de conídios. O isolamento e regeneração dos protoplastos foram efetuados em diferentes estabilizadores osmóticos. A maior produção de protoplastos ($3,25 \times 10^7 / ml$) foi obtida usando-se KCl 0,6M como estabilizador osmótico. As maiores taxas de regeneração foram conseguidas com protoplastos obtidos a partir de conídios germinando, utilizando-se como estabilizador osmótico o Mg SO₄ 0,5M para o isolamento e sorbitol 1,2M ou Mg SO₄ 0,5M para a regeneração.

Introduction

The biomass found as agricultural remains, urban and industrial rejects, that every year accumulates in larger amounts, results in an environmental deterioration and in a loss of valuable energetic resources. According to recent data, 2300 millions tons of domestic, urban, industrial and agricultural rejects are produced per year in the European Economic Community and in the whole world the reject production is estimated in 2 billions tons/year (3, 10). It is calculated that these rejects are composed of 40-60% cellulose, 15-10% hemicellulose and 10-30% lignin. The enzymatic cellulose break down has enormous potential economic applications like the production of glucose, soluble sugars, ethanol, xylosis, etc. Nevertheless no

a significative method using cellulase has been developed due to the high enzyme costs in the total cost of the process. Some economic data (7) estimate that this high cost occur mainly by the low productivity of the enzymatic complex producing strains and by the low cellulase substrate specificity. In order to overpass these problems some breeding programs have been developed trying to get hypercellulolytic microorganisms mainly of the *Trichoderma* genus. The searching of efficient protocols for protoplast release might help these species breeding programs and this has already been reported for *Trichoderma reesei* and *Trichoderma pinophilum* (2, 11, 12, 22, 23). It has also been shown that protoplasts are essential in studies of recombination and genetic transformation (17, 19, 21).

In the present work it was attempt

to develop and efficient protocol for protoplast isolation and regeneration in a cellulolytic strain of *Aspergillus niger*. This strain has been used for amylase industrial production in the United States and it was recently reported by Goldman (8) as good cellulase producing one. The other objective of this work was to perform cytological observation in these protoplasts.

Material and Methods

Microorganism - *Aspergillus niger* NRRL-337, kindly provided by Dr. Tobias J.B. Menezes (Ital, Campinas, Brazil).

Culture media - The culture media used were: complete medium (18); YGT medium (yeast extract, 5g; glucose, 20g; tween - 80, 0.2% distilled water, 1000ml); YG medium (the same composition of YGT without tween - 80).

Osmotic stabilizers - All the different concentrations of KCl stabilizers were dissolved in 0.2M phosphate buffer pH 5.8; MgSO₄ 4 stabilizer was dissolved in 0.02M phosphate buffer pH 5.6 and sorbitol was dissolved in 0.01N Tris-HCl, pH 5.8.

Giems solution - One part of Giems was dissolved in 66 parts of glicerine at 60°C and after cooling it was mixed with 66 parts of methanol.

Isolation and regeneration of protoplasts

a) **From mycelium (9)** - One ml of conidia suspension of *A. niger* NRRL-337 (1.0 x 10⁷ conidia/ml) was inoculated into 250ml conical flasks containing 50ml of liquid complete medium. They were incubated on a rotary shaker (150 rev.min⁻¹) for 18h at 28°C. After that mycelium was vacuum filtered through filter paper and washed with the appropriate osmotic stabilizer according to the treatment. The wet weight was determined. The lytic system contained 5.0ml of the osmotic stabilizer (1.2, 1.4 or 1.6M KCl; 1.0M MgSO₄ or 2.4M

sorbitol), 12.5mg of Novozym 234 (Novo Industry), 12.5mg of CP cellulase (John Sturge) and 250mg of wet mycelium giving a total volume of 10ml. It was incubated in rotary shaker for 3h at 28°C. Protoplasts were then collected by sedimentation at 400g/30 second. The supernatant was kept and centrifuged at 2900g/10 minutes at 4°C and the pellet obtained was rinsed twice with the specific stabilizer. This pellet was resuspended in 4.0ml of stabilizer and the number of protoplasts was obtained by counting in haemocytometer. They were plated in regeneration medium (complete medium + osmotic stabilizer) and incubated for 72h at 28°C. After this period protoplasts regeneration was estimated and corrected for the presence conidia and viable mycelial fragments.

b) **From germinative tubes (6)** - One ml of *A. niger* conidia suspension was inoculated into 150ml conical flasks containing 50ml of YGT medium incubated at 28°C for 9h the germinative tubes wet weight was determinated and it was settled the lytic system as following: 2.0ml of YG medium, 2.0ml of osmotic stabilizer (1.0M MgSO₄ or 2.4M sorbitol), 12.5mg of Novozym 234, 12.5mg of CP cellulase and 200mg of germinative tubes. It was incubated for 1h at 28°C in rotary shaker (150 rev min). The next steps followed the same described procedures.

Protoplasts staining (1) - Two or three drops from the pellet of the first sedimentation were spread on very clean glass slides inclined about 45°C. They were left to dry at room temperature for 15 minutes and then dipped in absolute methanol for 5 minutes. They were dried at room temperature, dipped again in N HCl for 2 minutes at 60°C washed in running water and rinsed in filtered water. A lay of 0.02M phosphate buffer pH 7.0 was put on the slides and Giems was dropped over them (3-5 drops) and left to stain for 2 minutes. They were washed in running water and then mounted.

Results and Discussion

Tables 1 and 2 show the results of

Table 1 - Isolation and regeneration of *A. niger* protoplasts from mycelium.

Concentration of Stabilizers	Number of protoplasts (10^6 ml^{-1})	Regeneration Media Complete Medium Plus Stabilizer as Indicated	Regeneration %
0.6 M KCl	32.5	0.6 M KCl	11.40
0.7 M KCl	10.0	0.7 M KCl	19.50
0.8 M KCl	5.6	0.8 M KCl	2.30
0.5 M MgSO ₄	0.6	0.5 M MgSO ₄	14.30
1.2 sorbitol	2.5	1.2 M sorbitol	23.30

Table 2 - Isolation and regeneration of *A. niger* protoplasts from germinative tubes.

Concentration of Stabilizers	Number of protoplasts (10^6 ml^{-1})	Regeneration Media Complete Medium Plus Stabilizer as Indicated	Regeneration %
0.5 M MgSO ₄	0.83	0.5 M MgSO ₄	53.30
		1.2 M sorbitol	58.00
1.2 M sorbitol	3.30	0.5 M MgSO ₄	5.40
		1.2 M sorbitol	6.40

isolation and regeneration of *A. niger* protoplasts. The highest protoplast yield ($3.25 \times 10^7/\text{ml}$) was obtained using 0.6M KCl as the osmotic stabilizer as already shown by Hamlyn & cols. (9). According to Davis (4) several types of osmotic stabilizers have been used in fungal protoplast isolation including inorganic salts, sugars and alcoholic sugars.

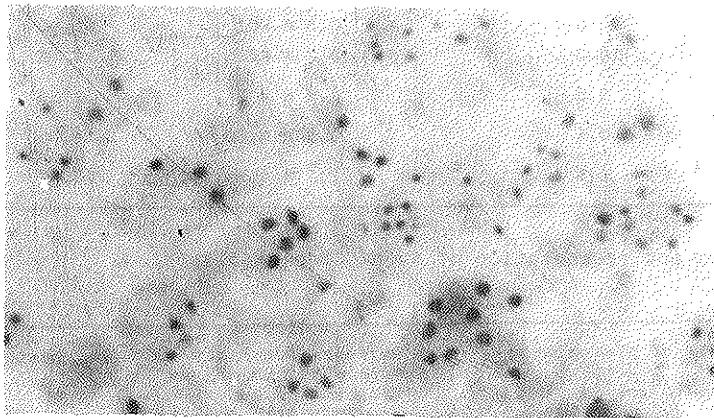
Depending on the organism it is well known that both the type and concentration of the osmotic stabilizer influence protoplast yield and stability. There is no universal osmotic stabilizer available for all kinds of fungal species (4). Inorganic salts suit filamentous fungal protoplasts isolation whereas for yeasts, alcoholic sugars are generally more suitable as osmotic stabilizers (9). The results have been confirmed by Musilkova & Fencl (13). Davis & col. (5), Hamlyn & col. (9), Roken & col. (20) and Borges (1), for different strains of *A. niger*. The *A. niger* used in this work gave highest

yields in using KCl as the osmotic stabilizer instead of sorbitol and MgSO₄. On the other hand, sorbitol released more protoplasts than MgSO₄ when mycelium was digested (Table 1). As far as the success of protoplast fusion and transformation in filamentous fungi depends on a good protoplast yield, these results might contribute towards the establishment of an efficient protoplast releasing protocol.

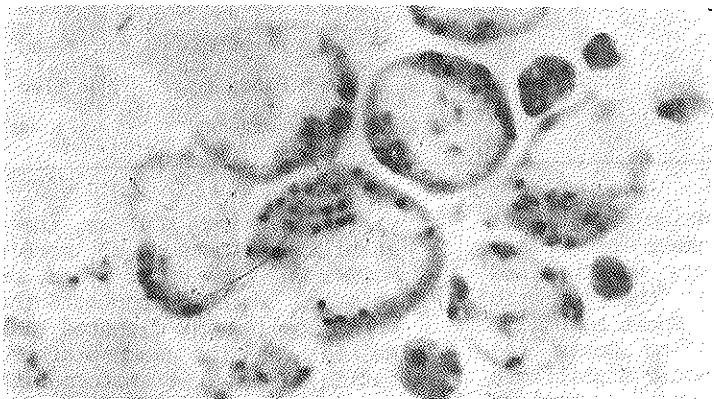
According to Peberdy (15, 16) the aspects of wall reconstitution and protoplast regeneration are the most intensely studied. The reason why protoplast regeneration varies so much is not known. In this work the higher regeneration rates were obtained from germinative tubes (6) using 0.5M MgSO₄ as osmotic stabilizer in the isolation and 0.5M MgSO₄ or 1.2 sorbitol in the reversion (Table 2). There is no reasonable explanation for the low reversion rates. Protoplasts were isolated in 1.2M sorbitol and left to regeneration in 0.5M MgSO₄ or 1.2M

Figure 1 - Nuclei condition in protoplasts of *A. niger*.

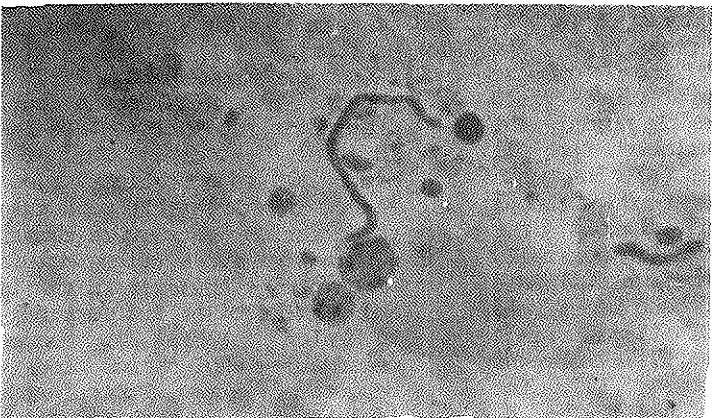
Symbols: 1.1 From mycelium: osmotic stabilizer KCl (1000x); 1.2 From mycelium: osmotic stabilizer MgSO₄ (400x) and 1.3 From germinative tubes : osmotic stabilizer MgSO₄ (400x).



1.1



1.2



1.3

sorbitol (Table 2). From mycelium, the stabilizers MgSO₄ and 1.2M sorbitol showed almost the same regeneration rates as 0.7M KCl did (Table 1). Protoplasts stabilized with 0.7M KCl showed almost twice the 0.6M KCl regeneration rate (19.5 to 11.40%), while 0.8M KCl gave 2.3% of regeneration. These results show that a slight variation in the osmotic stabilizer concentration gave rise to different responses in a same fungal species.

Figures 1.1 and 1.2 show the stained nuclei of *A. niger* protoplasts from mycelium. In both pictures protoplasts with different sizes and with different nuclei numbers can be seen. According to Necas & Svoboda (14), in unicellular fungi, protoplasts are equal to the essential cell size (or its multiples if cell is in division). On the other hand, fungi protoplasts released from multinucleated mycelium shows a wide range of heterogeneous structures with a variety of nuclei numbers and other cell organelles. This heterogeneity might be due to a non balanced distribution of the cytoplasmic content of one hypha region or the results of the protoplast releasing in different sites of the physiological hypha gradient (14). The protoplasts isolated in KCl showed in average no more than 10 nuclei for protoplast and for MgSO₄ 10 or more nuclei were normally found and some of them showed even 25 nuclei per protoplast. These results agreeded with those reported by Borges (1) that found up to 32 nuclei in *A. niger* 10V10 protoplasts where MgSO₄ was used as osmotic stabilizer. Peberdy (16) reported as well that *Aspergillus nidulans* protoplasts isolated in MgSO₄ showed a higher number of nuclei per protoplast than KCl.

Figure 1.2 shows that protoplasts released in MgSO₄ are bigger in size and highly vacuolated. The same results were found in *A. nidulans* (15) and *A. niger* (1). Although definitive explanation can not be found for this phenomenon, Peberdy (15) suggested that it could be totally osmotic or that other reasons like the cationhypha wall linkage might be involved. Since this method release protoplasts with larger diameters it

might be used in genetic studies of micromanipulation.

Figure 1.3 shows stained *A. niger* protoplast nuclei from germinative tubes (6). Protoplasts released in MgSO₄ showed a nuclear number from zero to 4. These protoplasts are smaller in size and less heterogeneous when compared with those released from mycelium and might be important for further genetic studies in this strain.

Summary

The definition of an efficient protocol for protoplast isolation and regeneration in a cellulolytic strain of *Aspergillus niger* was carried out. Cytological observations were made on protoplasts obtained from mycelial and germinative tubes. The isolation and regeneration was performed with different organic and inorganic osmotic stabilizers. The highest protoplast yield ($3.25 \times 10^7 / ml$) was obtained using 0.6M KCl as the osmotic stabilizer. Higher regeneration rates were achieved with protoplasts from germinative tubes using 0.5M MgSO₄ as osmotic stabilizer in the isolation and 0.5M MgSO₄ or 1.2M sorbitol, in the regeneration medium.

Acknowledgements

We thank FAPESP by supporting G.H. Goldman and CNPq for Marisa V. Queiroz.

References

- 1.Borges, M.I. - Techniques of protoplastization and isolation of DNA with high molecular weigh in *Aspergillus niger*. Master Science thesis, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1987.
- 2.Brown, J.A.; Ogawa, K. & Wood, T.M. - Studies on the preparation and regeneration of protoplasts from the cellulolytic fungus *Penicillium pinophilum*. Enz. Microb. Technol., 8:527-532, 1986.
- 3.Coughlan, M.P. - Cellulose hydrolysis: the potencial, the problems and relevant research at

- Galway. In: Cellulase: Production, properties and application (ed. M.P. Coughlan). Biochemical Society Transactions, 61th Meeting, Galway, p.405-406, 1985.
4. Davis, B. - Factors influencing protoplast isolation. In: Fungal protoplasts - applications in biochemistry and genetics (ed. J.B. Peberdy & L. Ferenczy), pp.45-71. Marcel Dekker, Inc., New York, 1985.
 5. Davis, B.; D'Avillez Paixão, M.T.; Deans, S.G. & Smith, J.E. - Protoplasts formation from giant cells of *Aspergillus niger*. Trans. Brit. Mycol. Soc., 69:207-212, 1977.
 6. Gambino, J.; Lawrence, G.B. & Morris, M.R. - Effects of mitotic and tubulin mutations on microtubule architecture in actively growing protoplasts of *Aspergillus nidulans*. J. Cell. Biol., 99:830-838, 1984.
 7. Ghose, T.K. & Ghosh, P. - Cellulase production and cellulase hydrolysis. Process Biochemistry, 14:11, 1979.
 8. Goldman, G.H. - Genetic studies and cellulase production by *Aspergillus niger*. Master Science thesis, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - Universidade de São Paulo, Brasil, 153p. 1988.
 9. Hamlyn, P.F.; Bradshaw, R.E.; Mellon, F.M.; Santiago, C.M.; Wilson, J.M. & Peberdy, J.F. - Efficient protoplast isolation from fungi commercial enzymes. Enz. Microbiol. Technol., 3, 1981.
 10. Humphrey, A.; Moreira, A.; Armiger, W. & Zabriskie, D. - Production of single-cell protein from cellulose wastes. Biotechnol. Symp., 7:45-64, 1977.
 11. Laurila, H.; Nevalainen, H. & Makinen, V. = Production of protoplasts from the fungi *Curvularia inaequalis* and *Trichoderma reesei*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21:210-212, 1985.
 12. Maczinger, L.; Ferenczy, L. - Somatic cell fusion of *Trichoderma reesei* resulting in new genetic combinations. Appl. Microbiol. Biotechnol., 22:72-76, 1985.
 13. Musilkova, M. & Fencl, Z. - Some factors affecting the formation of protoplasts in *Aspergillus niger*. Folia Microbiol., 13:235-239, 1986.
 14. Necas, O. & Svoboda, A. - Cell wall regeneration and protoplast reversion. In: Fungal protoplasts - applications in biochemistry and genetics (ed. J.F. Peberdy & L. Ferenczy). pp.115-33 Marcel Dekker, Inc., New York, 1985.
 15. Peberdy, J.F. - Wall biogenesis by protoplasts. In: Fungal walls and hyphal growth (ed. Burnett & Trinci). pp.49-70 Cambridge Press University, 1979.
 16. Peberdy, J.F. - Fungal protoplasts: isolation, reversion, and fusion. Ann. Rev. Microbiol., 33:21-39, 1979.
 17. Peberdy, J.F. - Protoplasts fusion - a tool for genetic manipulations and breeding in industrial microorganisms. Enz. Microb. Technol., 2:23-29, 1980.
 18. Pontecorvo, G.; Roper, J.A.; Hemmons, L.M.; Mac Donald, K.D. & Button, A.W.J. - The genetics of *Aspergillus nidulans*. Adv. Genet., 5:141-238, 1953.
 19. Rambosek, J. & Leach, J. - Recombinant DNA in filamentous fungi: progress and prospects. Critical rev. Biotechnol., 6:357-393, 1987.
 20. Roken, J.S.; Klein, D.; Toder, H. & Zomer, E. - Degradation of fungal cell wall taking into consideration the polysaccharide composition. Enz. Microb. Technol., 8:588-592, 1986.
 21. Silveira, W.D. & Azevedo, J.L. - Protoplast fusion genetic recombination in *Metarrhizium anisopliae*. Enz. Microb. Technol., 9:149-152, 1987.
 22. Toyama, H.; Yamaguchi, K.; Shinmyo, A. & Okada, H. - Protoplast fusion of *Trichoderma reesei*, using immature conidia. Appl. Environ. Microbiol., 47:363-368, 1984.
 23. Toyama, H.; Yokoyama, T.; Shinmyo, A. & Okada, H. - Interspecific protoplast fusion of *Trichoderma*. Biotechnol., 1:25-35, 1984.

Recebido para publicação em 30/8/89

INFORMAÇÃO TÉCNICO-CIENTÍFICA SBM

Fundadores da Sociedade Brasileira de Microbiologia de acordo com relação constante de PG 1 a 2 verso do livro de atas -

01. Genésio Pacheco, Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro
02. Milton Thiago de Mello - Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro
03. Rudolph P. Atcon - CAPES. Rio de Janeiro
04. Antenor Pupo : Escola de Química do Paraná - Fac.Med. Curitiba - Paraná
05. Hebe Martelli - Escola Nacional Química - Lab. de Microb. Industrial
06. Raymundo Muniz de Aragão - Escola Nacional Química - Cat.Microb.Industrial
07. Gobert Araújo Costa - Instituto Oswaldo Cruz
08. Newton Neves da Silva - Instituto Pesquisas Biológicas - Rio Grande do Sul
09. Manoel F. Teixeira - Inst. Pesq.Veterin. "Desiderio Finamor".
10. Aleixo de Vasconcellos - Faculdade Ciências Médicas - Rio de Janeiro
11. Harvey Ribeiro de Souza - Inst. Seleção e Controle M. Aeron.
12. Paulo Diniz Carneiro - Fac.Med. da U.M.G. - Belo Horizonte
13. Roberto de Almeida e Cunha - Faculdade de Medicina da U.M.G.
14. Anibal Medina de Azeredo - Representante do S.S. do Exército
15. Washington A. de Almeida - Inst. Biologia do Exército
16. H. Moussatché - Instituto Oswaldo Cruz e Soc.Bras.Progr. Ciência
17. Herman Lent - Instituto Oswaldo Cruz.
18. Arlette Ubatuba - Instituto Oswaldo Cruz
19. José Ananias Figueira da Silva - Instituto Oswaldo Cruz
20. Côrtes Villela - Faculdade de Medicina - Juiz de Fora
21. Nilson Carvalho da Silva - Dep. Pesq. Ind. Schering
22. Fridolin Schlogel - Esc. Sup. Agric. Vet. Paraná
23. Lycio Grein de Castro Vellozo - Esc. Sup. Agric. Vet. do Paraná
24. Noélia Cavalcante - Inst.Puericultura da U.B.
25. Rita Cardoso - Inst. Puericultura - Inst.Oswaldo Cruz
26. Ivone Rocco Suassuna - Inst.Microbiologia da U.B.
27. Italo Suassuna - Inst.Microbiologia da U.B.
28. Helena Carone de Almeida Cardoso - Instituto de Microbiologia da U.B.
29. Marylena Pozzi Barreiros - Inst.Microbiologia da U.B.
30. Homero Salazar - Inst.Microbiologia da U.B.
31. Alcides F.Silva Jardim - Fac.Nac. de Farmácia
32. Henrique Barbosa da Cruz Filho - Inst.de Biologia do Exército
33. Leonhard Riedmuller - Inst.Biologia Animal Km.47 - Estado do Rio
34. Vicente Leite Xavier - Escola Nacional Veterinária
35. Agostinho Lombardo - Instituto Biologia Animal
36. Bernardino Ladeira - Faculdade de Medicina Univ.de M.G. Belo Horizonte
37. Amadeu Cury - Instituto de Microbiologia da U.B.
38. Metry Bacila - Inst. Biol. Pesq. Tecnol. Curitiba - Paraná
39. Gilberto Villela - Instituto Oswaldo Cruz - Inst.Puericultura
40. Pio Cesar de Lobão Portelada - Lab.Lederle do Brasil-Ass.B.Farm.
41. João Ciribelli Guimarães - ss White Dental - Inst.Microbiol.U.B.
42. Moysés Abrahan Fuks - Instituto Microbiologia da U.B.
43. Oswaldo Luiz de Athaíde - Hospital Central da Marinha
44. Dorival Salgado Veloso - IPUB
45. Augusto Raphael M. Braga - IPUB
46. Silvio B. de Souza - IPUB
- 47.
48. Olavo Nery - IPUB
49. Alberto de Oliveira - IPUB
50. Décio Silveira - Diretoria de Vet.Exército
- 51.
52. Joaquim Francisco dos Santos - Diret. Vet. Exército
53. Taylor Ribeiro de Mello - Escola Fluminense Med.Veterinária
- 54.
55. Moacyr Alves de Souza - Escola Nacional Veterinária
- 56.
57. Raymundo G. Cunha - Centro

Panamericano de F.Aftosa
 58. Abreu Mortins - Centro
 Panamericano de Febre Aftosa
 59. Guilherme Ferreira Pinto -
 Instituto Biológico do Exército
 60. Niber da Paz Moreira da Silva -
 Instituto Oswaldo Cruz
 61.
 62.
 63. Rafael Osório - Instituto
 Oswaldo Cruz
 64. Antonio Caruso Cosentino - IPUB
 65. Alcyone da Cunha Rangel - IPUB
 66. Sidney Inocêncio Reis - IPUB
 67. Yanchel Fuchs - IPUB
 68. Amaury Diogo Goudim - IPUB
 69. Nea Martins - IPUB
 70. Arthur Alves Passos Salles -
 IPUB
 71.
 72. José Primo da Silva - IPUB
 73. Nicean Telles de Souza - IPUB
 74. Walcy Satyro - IPUB
 75. A.B. Canavarros - IPUB
 76. Elias José Rodman - IPUB
 77. Ubirajara Rodrigues - IPUB
 78. Andifax Gonçalves de Azevedo -
 IPUB
 79. Oswaldo Fernandes Leão - IPUB
 80. Umberto Rizzo - IPUB
 81. Angelus R. Albano
 82. Vinicius Moreira Dias
 83. Mauricio Teichholz -
 Dep.Pesq.Ind. Schering
 84. Luiz R.Tavares de Macedo -
 Inst.Biol.Animal
 85. Joaquim Travassos - Instituto de
 Microbiologia da U.B.
 86. Laerte de Andrade - Inst.Oswaldo
 Cruz e Inst.Microbiologia da U.B.

Statistical aspects of the
 microbiological analysis of foods. B.
 Jarvis. Elsevier Science Publishers
 B.V., 1989

Este livro corresponde ao volume 21 da série "Progress in Industrial Microbiology". Trata-se, na verdade, de uma monografia sobre Estatística, escrita por um microbiologista de alimentos, que observou as dificuldades dos profissionais da área biológica em compreender os conceitos estatísticos necessários para a correta interpretação de seus resultados laboratoriais. O objetivo

principal da monografia é expor, de maneira simples e objetiva, os fatores estatísticos que podem afetar os resultados obtidos na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos e produtos afins. A monografia é subdividida em 10 capítulos, que além dos conceitos estatísticos básicos, aborda as implicações da variação natural na distribuição de microorganismos, os efeitos da amostragem em métodos quantitativos e métodos P/A (presença -ausência), os fatores que afetam os resultados obtidos através de métodos diferentes e a possível correlação entre resultados assim obtidos e as implicações da variação estatística nos padrões microbiológicos para alimentos. Quatro capítulos são dedicados aos erros operacionais associados às técnicas de contagem de colônias, aos métodos de contagem por diluição seriada, aos métodos tipo P/A, aos métodos indiretos e também aos erros relacionados com a preparação das amostras para análise. Os capítulos são fartamente ilustrados com exemplos oriundos da experiência do autor como microbiologista de alimentos, o que facilita bastante a compreensão dos conceitos abordados.

Profa.Dra. Bernadette D.G.M. Franco
 Depto. de Alimentos e Nutrição
 Experimental - FCF / USP.

Boddy, L.; Marchand, R. & Read, D.J. (eds) - nitrogen, phosphorus and sulphur utilization by fungi. Cambridge University. Symposium, 1989, 361 p.

Este livro aborda tema do 6º Encontro de Brish Mycological Society, realizado em abril de 1988 na Universidade de Birmingham, enfocando aspectos relativos ao metabolismo do nitrogênio, fósforo e enxofre, divididos em 4 áreas: fisiologias e metabolismo do nitrogênio, fósforo e enxofre em fungos (capítulos 1 a 6); o papel desses minerais na associação patogênica com plantas (capítulos 7 e 8); no relacionamento

mutualístico com plantas (capítulos 9 a 12); e o papel dos fungos no ciclo desses elementos dentro do ecossistema (capítulo 13).

A literatura referente à fisiologia e bioquímica é intensamente abordada pelos autores, bem como, algumas sugestões são formuladas objetivando futuras pesquisas na área. É um livro indicado para especialistas, pela atualidade e profundidade de seus temas.

Dr. Benedito Corrêa
Dept. de Microbiologia ICBUSP

Interferon and nonviral pathogens.
Gerald I. Byrne e Jenifer Turco, editores. Immunology Series, vol. 42. Marcel Dekker Inc., New York e Basel, 1988.

A relação entre os interferons, imunidade e patógenos não virais tem sido investigada há mais de 20 anos. Contudo, estava faltando uma revisão sistematizada dos dados obtidos. Este livro vem preencher esta lacuna.

A obra é dividida em três partes. A primeira compreende dois capítulos de revisão - o inicial discorre sobre os interferons e sua indução e o seguinte aborda os interferons e seu mecanismo de ação. A segunda parte descreve as relações dos interferons com os parasitas intracelulares obrigatórios - clamídias, ricketssias, *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, plasmódio. Na última, encontram-se os capítulos que tratam dos patógenos intracelulares facultativos - *Listeria*, micobactérias, *Legionella* e bactérias entero-invasoras. Cada capítulo dedicado aos patógenos foi escrito por autores com experiência na respectiva área de conhecimento. Trazem, em seu início, uma revisão suscinta sobre a biologia e patologia do agente, a imunidade da doença e a atividade dos interferons - especialmente o gama - na defesa do hospedeiro. Em seguida, os autores focalizam a sua contribuição pessoal.

A revisão sobre interferons é suficientemente detalhada para que o

leitor não familiarizado com o tema compreenda os capítulos restantes. O tema - interferon e seu mecanismo de ação - trata especificamente de aspectos da imunidade celular nas infecções microbianas e o papel do interferon gama.

No primeiro capítulo da segunda parte do livro, a relação entre clamídias e interferon gama e o mecanismo de inibição dos parasitas é muito bem apresentada. As infecções persistentes por clamídia e suas conexões com o interferon gama são estudadas experimentalmente por Sherner e Iasov, mas as evidências não são muito convincentes. A inibição do crescimento de *Rickettsia prozweki* por interferon gama, o seu mecanismo de ação "in vitro" e o papel deste interferon "in vivo" em várias ricketssioses experimentais constitui capítulo abordado de forma muito estimulante. A proteção desencadeada pelo interferon gama a macrófagos "in vivo" e "in vitro" à infecção pelo *Toxoplasma gondii* inclui os elegantes e conclusivos estudos de Pfefferkorn a respeito da natureza bioquímica deste fenômeno e é um dos assuntos mais interessantes do livro. O papel do interferon gama e as atividades sinérgicas com outras linfocinas na inibição de *Leishmania* é revisado de modo claro e abrangente. As relações do *Trypanosoma cruzi* e o sistema interferon são objeto de dois capítulos: no primeiro, o enfoque é de uma revisão mais geral, incluindo as contribuições pessoais dos autores; no seguinte, relata-se o papel do interferon gama na infecção experimental do camundongo com os dados obtidos pelos autores. Os efeitos do interferon gama na infecção experimental pelo *Plasmodium berghei* "in vivo" e "in vitro" inclue os exaustivos estudos dos autores.

A indução de interferon por bactérias e os interferons murinos são objeto de curta revisão, seguida das investigações sobre o papel do interferon na listeriose murina. Aqui um detalhamento exagerado das experiências prejudica o gosto da leitura. Segue-se um capítulo agradavelmente crítico sobre o

possível envolvimento do interferon na imunidade sobre as infecções por micobactérias. Conforme se depreende da leitura, o papel dos interferons nas infecções por *Legionella pneumophila* foi muito pouco investigado e merece a atenção dos pesquisadores. De maior importância no nosso meio, a invasão celular por bactérias gram-negativas, o papel coadjuvante agressivo dos vírus e como os interferons bloqueiam este fenômeno é assunto do último capítulo do livro.

Trata-se de uma publicação para pesquisadores, com interesse nos assuntos relatados. Devido ao formato dos capítulos - de revisão abrangente do tema com detalhes experimentais e especulações interessantes ao final do texto será, sem dúvida, leitura estimuladora para novas pesquisas.

Prof. Dr. Romain Rolland Golgher
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

Universidade Federal Fluminense
Núcleo de documentação

Entre 4 e 6 de setembro, o Núcleo de Documentação da Universidade Federal Fluminense, com o apoio de várias empresas e entidades e patrocínio da ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas - e CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - , realizou em Niterói o ENCONTRO NACIONAL DE NORMALIZAÇÃO DE TRABALHOS TÉCNICOS, CIENTÍFICOS E CULTURAIS. O Encontro reuniu cerca de 200 participantes de todo o Brasil, entre técnicos de várias áreas de conhecimento, sotressaindo bibliotecários, pesquisadores , mestrandos e doutorandos, além de profissionais de empresas que lidam com normas técnicas.

O êxito do Encontro traduz a necessidade sentida pela comunidade científica, acadêmica e empresarial na definição de normas sistematizadas, cuja ausência ou inadequação tem reflexos

negativos no desenvolvimento da tecnologia e da pesquisa nacional.

A partir de um documento básico, elaborado pelo NDC-UFF, reunindo 66 fontes de várias universidades brasileiras e entidades diversas, o Encontro se deteve na análise e discussão deste documento, para elaboração de uma sistematização final que servisse de subsídio para a revisão, unificação e implantação de novas normas da ABNT, uma urgente necessidade e aspiração coletiva. O documento elaborado pelo Encontro, por sua abrangência e detalhamento, servia ainda para complementar os casos omissos nas normas atuais, tanto no uso cotidiano das universidades, como na operação de empresas das áreas de informática, medicina, engenharia e outras.

As conclusões do Encontro estão à disposição dos interessados, no Núcleo de Documentação da UFF - tel. 710-6060.

UFF - Núcleo de Documentação
Av. Bento Maria da Costa, 115-A
Juruá - Niterói - RJ

2º Encontro Latino-americano de doenças infecciosas - Santa Maria - RS
- 13 a 17 de junho de 1990.

Esse evento promovido pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Universitário de Santa Maria e Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Maria tem sua programação científica abordando as infecções na área materno-infantil. Serão desenvolvidos cursos sobre "Prevenção e Controle da Infecção Hospitalar", e "Microbiologia em controle de infecções e vários painéis e conferências : Infecções no Binômio mãe-filho; Doenças sexualmente transmissíveis; A.I.D.S., Doença inflamatória pélvica; infecções respiratórias; infecções do trato respiratório; septicemias; infecções cirúrgicas; antibioticoprofilaxia; antibioticoterapia, dentre outras.

Maiores informações com:
Profa. Jane Margarete Costa
Universidade Federal de Santa Maria
Santa Maria - RS

LILACS

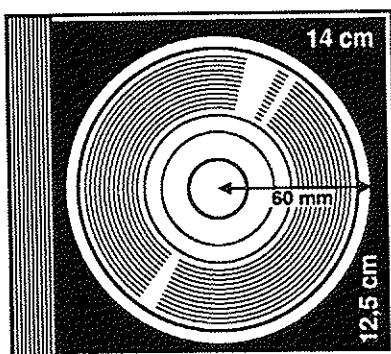
CD-ROM



*Esta é a maior área útil da saúde
BRASILEIRA, LATINO-AMERICANA e
do CARIBE.*

LILACS CD-ROM: a mais completa e atualizada base de dados já produzida para registrar e difundir mundialmente a produção intelectual do profissional de saúde do Brasil, da América Latina e do Caribe.

Graças a uma tecnologia avançadíssima, a BIREME conseguiu reunir, em um único Compact Disc, citações bibliográficas e resumos de documentos, desde 1982, num esforço conjunto com os países da Rede Latino-americana e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde. E mais: além de LILACS, cada disco ainda traz a base de dados REPIDISCA, com documentos das ciências do



ambiente e engenharia sanitária coletados pelo Centro Panamericano de Engenharia Sanitária e Ciências do Ambiente. Para penetrar neste universo de informações você só precisa de um micro compatível com o PC -XT ou AT e

um equipamento de leitura de **CD-ROM**. A BIREME fornece o software para acessar **LILACS CD-ROM**.

Entre hoje mesmo em contato com a BIREME e receba, de 3 em 3 meses, um novo CD que traz, além do conteúdo anterior, os últimos artigos analisados e indexados. O preço

da assinatura anual é apenas US\$ 120,00* no câmbio oficial.

BIREME

Centro Latino-americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde

Rua Botucatu, 862 - 04023 - São Paulo - Brasil - Telex: 1122143 OPAS BR - Tel.: (011) 549-2611 - Fax.: (011) 571-1919

Organização Panamericana da Saúde - OPAS



OMS - Organização Mundial da Saúde

* Preço válido para a América Latina e Caribe. Para os demais países US\$ 250,00.

A Sociedade Brasileira de Microbiologia e a Revista de Microbiologia agradecem os seguintes profissionais que atuaram na assessoria da Revista de Microbiologia vol. 20, 1989.

ADAUO IVO MILANEZ
ADHEMAR PURCHIO
ALCIDES SERZEDELLO
ALLEN NORTON HAGLER
ANDREJUS GOROLKOVAS
ANTONIO FERNANDO PESTANA DE CASTRO

ARAMIS AUGUSTO PINTO
ARLETE EMILY CURY
ASTREA MENNUCCI GIESBRECHT
AUGUSTO CEZAR MONTELLI
BEATRIZ VAHAN KILIKIAN
BEATRIZ VALAVICIUS
BENEDITO CORRÉA
C. ALFENAS
CAIO MARCIO FIGUEIREDO MENDES
CARLOS EMILIO LEVY
CELESTE FAVA NETTO
CELIDEIA C. VAZ
CLARICE QUEICO FUJIMURA LEITE
CLAUDETE RODRIGUES PAULA
CLAUDIO MESSIAS
DAISON OLZANY SILVA
DEISE PASETO FALCÃO
DÉLIA R. AMAYA
EDIR NEPOMUCENO DA SILVA
EDMAR CHARTONE DE SOUZA
EDUARDO NASCIMENTO MÓS
ELIZABETH OLIVEIRA DA COSTA
ELSA M. MAMIZUKA
ERNESTO HOFER
ESTHER G. BIRMAN
FLÁVIO ZELANTE
FRANCISCA PESSOA DE FRANÇA
GALBA MARIA A. DE CAMPOS TAKAKI
GILDA DEL NEGRO
HÉLIO GELLI PEREIRA
HELOIZA R. BARBOSA
HOMERO FONSECA
HENRI ABOUT-BOUL
HERMANN GONÇALVES SCHARTZMAYR
IONICE FELIPE
ISES DE ALMEIDA ABRAHANSON
ITALO SUASSUNA
JOÃO LUCIO DE AZEVEDO
JOHANNA DOBEREINER
JORGE TIMENETSKY
JOSÉ ANTONIO JEREZ
JOSÉ S. DE OLIVEIRA
KLAUS EBEHARD STEWIEN
KEIDI UJKAWA

LEDA MENDONÇA HAGLER
LEONARDO PEREGO JUNIOR
LEÔNICO BRAZZACH
LUZINETE ACIOLE DE QUEIROZ
MARCELO MAGALHÃES
MARGARETH SIMÕES
MARIA APARECIDA DE RESENDE
MARIA APARECIDA SHIKANAI YASUDA
MARIA DE FÁTIMA COSTA PIRES
MARIA HELENA JULIANI
MARIA INES ZANOLI NETO
MARIA JOSÉ MENDES GIANNINI
MARIA LIGIA COUTINHO CARVALHAL
MARIA LUCIA B. O. RACZ
MARIA LUCIA CERQUEIRA CAMPOS
MARIA REGINA FERNANDES TOLEDO
MARIA THEREZINHA MARTINS
MARIO T. SHIMIZU
MAURO FABER LEITÃO
MICHELLE VITOLO
MOACYR ALCOJARADO REBELLO
MYRNA SABINO
ÓLGA FISHMAN COMPERTZ
PAULO H. YASUDA
PAULO P. GONTIJO FILHO
PAULO SUYOSHI MINAMI
PETRA S. SANCHÉZ
REGINA AYR FLORIO DA CUNHA
ROBERTO MITIO YANAGUITA
ROMAIN ROLLAND GOLGHER
SEBASTIÃO TIMO IARIA
SÉRGIO OLAVO PINTO DA COSTA
SILVIO ARRUDA VASCONCELOS
SIRDEIA MAURA PERRONE FURLANETO
VALTER ROBERTO LINARDI
WALDEMAR FRANCISCO
WALDEREZ GAMBALE
ZOILO PIRES DE CAMARGO

Revista de Microbiologia
Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

VOLUME 20 JANEIRO-MARÇO 1989 NÚMERO 1

Figueiredo A.M.S.; & Benchetrit L.C.	
Estocagem de bacteriófagos de <i>Streptococcus pyogenes</i> na presença de substâncias crioprotetoras	1
Storage of bacteriophages from <i>Streptococcus pyogenes</i> in the presence of cryoprotective substances	
Svidzinski, T.I.E.; Oliveira, T.C.R.M. de; & Herrero, F.	
Diagnóstico laboratorial e importância clínica da <i>Gardnerella vaginalis</i> em pacientes com infecção vaginal	5
The clinical importance and laboratory diagnosis of <i>Gardnerella vaginalis</i> in patients with vaginal infections	
Figueiredo, A.M.S.; Velazco, C.; & Benchetrit, L.C.	
Lisogenia e resistência à tetraciclina em estreptococos do grupo A	10
Lysogeny and resistance to tetracycline in group A streptococci	
Rodrigues, D. dos P.; Solari, C.A.; Ribeiro, R.V.; Costa, J.E.C.M.; Reis, E.M.F. dos; Silva F., S.J. da; & Hofer, E.	
<i>Salmonella</i> em água de praias do município do Rio de Janeiro, RJ	12
<i>Salmonella</i> from sea water collected in the beaches of Rio de Janeiro city	
Gallardo, P.B.; & Panno, L.C.	
Control biológico de la marchitez bacteriana de la papa (<i>Solanum tuberosum</i> L.) inducida por <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smith	18
Biological control of bacterial wilt potato induced by <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smity	
Gallardo, P.B.; Panno, L.C.; & Guichaquelén, V.G.	
Inhibición "in vivo" de <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smith utilizando la cepa antagonista BC8 de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	27
Inhibition "in vitro" of <i>Pseudomonas solanacearum</i> E.F. Smith by using the antagonist BC8 strain of <i>Pseudomonas fluorescens</i>	
Paula, O.M. de; Borges, A.C.; Guimarães, W.V.; & Silva, D.O.	
Comportamento de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> na presença dos plasmídios RK2 ou RP4	34
Behavior of <i>Bradyrhizobium japonicum</i> in the presence of plasmids RK2 or RP4	
Sant'Ana, Y.X.; Chartone-Souza, E.; Ferreira M. das D.	
Resistência a drogas e colicinogénia em linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> isoladas de ribeirões-esgotos e de pacientes em Belo Horizonte, Brasil	41
Drug resistance and colicinogeny of <i>Salmonella typhimurium</i> strains isolated from sewage-contaminated surface water and humans in Belo Horizonte, Brasil	
Araujo, F.L. de; Nunes, M.P.; & Ricciardi, I.D.	
Produção de enterotoxina por <i>Moraxella bovis</i>	50
Production of enterotoxin by <i>Moraxella bovis</i>	
Peres, A.G.; Silva, M.G. da; Silva David, M.T.S. da; & Gontijo F., P.P.	
Influência do inóculo bacteriano no teste de susceptibilidade as quinolonas pelo método de diluição em ágar	53
Effect of the inoculum on the activity of quinolones using the agar dilution procedure	

- Vasconcellos, S.A.; Ohtsubo, I.; Moretti, A.S.; Ito, F.H.; Passos, E. de C.; Cártes, J. de A.; & Yasuda, P.H.
Ausência de resposta imunológica humoral em suínos que receberam água de beber contaminada com *Leptospira biflexa* estirpe Buenos Aires
Absence of humoral immunological response in swines whose drinking water was contaminated with *Leptospira biflexa* strain, Bueno Aires 56
- Vasconcellos, S.A.; Ohtsubo, I.; Moretti, A.S.; Ito, F.H.; Passos, E. de C.; Cártes, J. de A.; Moreno, A.G.; & Yasuda, P.H.
Emprego do antígeno de *L. biflexa* estirpe Buenos Aires na reação de soro-aglutinação microscópica aplicada ao diagnóstico da Leptospirose em suínos experimentalmente infectados com *L. interrogans*
Use of the *L. biflexa* strain Buenos Aires for performing the microscopic-agglutination test for leptospirosis in swine experimentaly infected with *L. interrogans* serovar pomona 62
- Balen, L.; Silva, E.N. da; Andreatti F.; R.L.; Gaviolle, M.C.; & Cappellaro, C.E.M.P.D.
Conservação da amostra Conn-F de *Mycoplasma gallisepticum* pelo congelamento e liofilização
Preservation of strain Conn-F of *Mycoplasma gallisepticum* by freezing and lyophilization 71
- Cereda, M.P.; Antonangelo, A.T.B.F.; Gomes, M.I.F.V.; & Goldoni, J.S.
Seleção de leveduras a partir de caldo de sorgo sacarino (*Sorghum bicolor* L.) em fermentação natural
Selected yeasts from *Sorghum* juices (*Sorghum bicolor*, L.) in natural fermentations 78
- Lima, E.A. de L.; & Tigano, M.S.
Citologia das estruturas leveduriformes de *Beauveria bassiana* em meios de cultura líquidos e na hemolinfa de *Spodoptera frugiperda*
Cytology of the yeast-like structures of *Beauveria bassiana* in liquid media and in the hemolymph of *Spodoptera frugiperda* 85
- Schoenlein-Crusius, I.H.; Milanez, A.I.
Successão fúngica em folhas de *Ficus microcarpa* L.F. submersas no lago frontal situado no Parque Estadual das fontes do Ipiranga São Paulo/SP
Fungal succession on *Ficus microcarpa* L.f. leaves submerged in frontal lake in the Parque Estadual das Fontes do Ipiranga São Paulo State, Brazil 95
- Cury, A.E.; Miche, M.P.; & Minami, P.S.
Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade a antibióticos poliênicos
Incidence and polyene susceptibility of yeasts recovered from cancer patients undergoing antineoplastic therapy 102
- Facciotti, M.C.R.; Kilikian, B.V.; Schmidell, W.; & Fachini E.R.
Processo descontínuo de síntese de amiloglicosidase por *Aspergillus awamori*: influência do pH e da concentração inicial de polissacarídeo
Glucoamylase synthesis in batch process by *Aspergillus awamori*: influence of pH and initial polysaccharide concentration 108
- Fowler, H.G.
Um iridovírus epizoótico de Orthoptera (Gryllotalpidae: *Scapteriscus borellii*) e sua patogenicidade em cupins (Isoptera: *Cryptotermes*)
An epizootic iridovirus of orthoptera (Gryllotalpidae: *Scapteriscus borellii*) and its pathogenicity to termites (Isoptera: *Cryptotermes*) 115

Ernst M., S.; & Frabraega G., F.

Epidemiologia da raiva em Chile, 1950-1986: Um estudo descretivo de casos de raiva confirmados pelo laboratório
Epidemiology of rabies in Chile, 1950-1986: a descriptive study of laboratory - confirmed cases

121

Kotait, I.; Peixoto, Z.M.P.; Queiroz, L.H.; Cunha, E.M.S.; Souza, M.C.A.M.
Macruz, R.; & Freitas, C.A. de

"Diagnóstico laboratorial do aborto equino a vírus através de imunofluorescência e soroneutralização"
Laboratorial diagnosis of Equine Virus Abortion through immunofluorescence and serumneutralization test

128

Vieira, A.A.H.; & Nascimento, O.R.

Imobilização de íons Cu²⁺ por compostos de alto peso molecular excretados por *Ankistrodesmus densus* (*Chlorophyceae*) em diferentes idades de cultivo
Copper immobilization by high molecular weight compounds excreted by aging culture of *Ankistrodesmus densus* (*Chlorococcales*)

133

Informação Técnico-Científica SBM

141

VOLUME 20 ABRIL-JUNHO 1989 NÚMERO 2

Borges, M. de F.; Brandão, S.C.C.; & Pinheiro, A.J.R.

Efeito bactericida do peróxido de hidrogênio sobre *Salmonella* em leite destinado a fabricação de queijos

Bactericidal effect of hydrogen peroxide on *Salmonella* in milk employed to cheese manufacture

145

Queiroz, J.H. de; & Maugeri Filho, F.

Otimização da produção de dextrana-sacarase de *Leuconostoc mesenteroides* à partir de melâço como fonte de carbono

Optimization of the production of dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* using molasses as carbon source

150

Costa, A.L. da; & Levy, C.E.

Caracterização do *Staphylococcus aureus* e do *Staphylococcus epidermidis*: estudo comparativo entre os testes convencionais e o teste da termonuclease

Caracterization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: comparative study using the conventional tests and the thermostable nuclease test

157

Salvador, S.L. de S.; Baracchini, O.; Ito, I.Y.; & Verri, R.A.

Ocorrência de *Staphylococcus aureus* na saliva, orofaringe e fossas nasais de indivíduos saudáveis

Occurrence of *Staphylococcus aureus* in saliva, throat and nose in healthy individuals

165

Noletto, A.L.S.; & Tibana, A.

Sensibilidade a antimicrobianos de *Yersinia* spp isoladas de alimentos na cidade no Rio de Janeiro

Antimicrobial susceptibility of *Yersinia* spp isolated from foods in Rio de Janeiro

170

Magalhães, M.; & Magalhães, V.

Atividade in vitro do Lomefloxacin comparada a do norfloxacin, gentamicina e cefotaxima

In vitro activity of Lomefloxacin compared of that Norfloxacin, Gentamicin, and Cefotaxime

174

Merquior, V.L.C.; & Benchetrit, L.C.	
Efeito de concentrações submínimas inibitórias de penicilina sobre hialuronidase e hemolisina de estreptococos do grupo B Effect of subminimal inhibitory concentrations of penicillin on group B streptococcal hyaluronidase and hemolysin	178
Simionato, M.R.L.; Zelante, F.; & Cunha, R.A.	
Análise fenética aplicada na elucidação da posição taxonómica de cepas orais de <i>S. sanguis</i> I, <i>S. sanguis</i> II e <i>S. mitis</i> Phenetical study applied in the elucidation of the taxonomical position of oral strains of <i>S. sanguis</i> I, <i>S. sanguis</i> II and <i>S. mitis</i>	184
Simionato, M.R.L.; & Zelante, F.	
Análise fisiológica de cepas orais de <i>Streptococcus sanguis</i> I, <i>Streptococcus sanguis</i> II e <i>Streptococcus mitis</i> Physiological analysis of oral strains of <i>Streptococcus sanguis</i> I, <i>Streptococcus sanguis</i> II and <i>Streptococcus mitis</i>	190
Lerayer, A.L.S.; & Chopin, M.-C.	
Perfil de plasmídios e resistência a bacteriófagos em estreptococos lácticos mesófilos Plasmid profiles and bacteriophage resistance of mesophilic lactic streptococci	197
Fulgueira, C.L.; & Bracalenti, B.J.C. de	
Método rápido y económico para detectar Aflatoxinas y Zearalenona en alimentos para animales Rapid and economic method to detect Aflatoxins and Zearalenone in animal feed	210
Fulgueira, C.; Borghi, A.L.; & Bracalenti, B.J.C. de	
Inhibición de <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 por una cepa de <i>Streptomyces</i> sp Inhibition of <i>Aspergillus parasiticus</i> NRRL 2999 for a strain of <i>Streptomyces</i> sp	215
Machado, J.O.; Ferreira, M.E.; Nakazawa, E.K.; Nahas, E.; & Malheiros, E.B.	
Efeito de inóculo de fungos micorrízicos vesículo arbusculares provenientes de diferentes plantas doadoras sobre o milho Effect of inocula of vesicular arbuscular Mycorrhiza obtained from distinct plantas on corn	223
Silva, M. do R.R.; Silva, S. de P. e; Morais, D. de F. C.D.; Fernandes, O. de F.L.	
"Tinea capitis" por <i>Trichophyton verrucosum</i> - Relato de um caso "Tinea capitis" by <i>Trichophyton verrucosum</i> -Case reported	229
Nalin, D.A.; & Kiyan, C.	
Cultivo de <i>A. niger</i> e <i>A. oryzae</i> em vinhaça de madeira para a produção de biomassa Cultivation of <i>A. niger</i> and <i>A. oryzae</i> on wood vinasse for biomass production	233
Ferraz, A.; Durán, N.	
Efeito de várias condições no crescimento de <i>Chrysonilia sitophila</i> "TFB 27441" Effect of various conditions on the <i>Chrysonilia sitophila</i> "TFB 27441" growth	240
Goldman, G.H.; Fungaro, M.H.P.; Cereda, M.P.; & Azevedo, J.L. de	
Resíduos de mandioca induzem uma alta produção de enzimas celulolíticas Cassava residues induce high production of cellulolytic enzymes	246

Cury, A.E.; & Miche, M.P.	
Atividade de derivados imidazólicos contra espécies de <i>Candida</i> isoladas de pacientes com câncer	249
Imidazole antibiotics activities against <i>Candida</i> species recovered from cancer patients	
Jerez, J.A.; Candeias, J.A.N.; Durigon, E.L.; & Rács, M.L.	
Tipos eletroforéticos, de rotavírus bovino	254
Electrophoretic types of bovine rotaviruses	
Informação Técnico-Científica SBM	258

VOLUME 20 JULHO-SETEMBRO 1989 NÚMERO 3

Nader Filho, A.; Rossi Jr., O.D.; & Schocken-Iturrino, R.P.	
Avaliação das características microbiológicas do leite tipo "C" e das embalagens plásticas utilizadas no envase, em uma usina de beneficiamento do Estado de São Paulo, Brasil	261
Cañas, P.; Joyas, A.; Robeson, J. & Campos, V.	
Antibiotic and heavy metal resistance associated to plasmids in clinical isolates of <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Chile	267
Frâncio, B.D.G. de M.; & Bergamo, T.	
Análise microbiológica de misturas prontas destinadas ao tempero de alimentos ("Tempero pronto")	272
Microbiological quality of ready-to-use food seasonings	
Martins, M.T.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Pellizari, V.H.; Matsumoto, E.F.; Ribeiro, G.; Malateaux, S.; & Mayer, M.H.	
Utilização de bactérias e fungos como indicadores na avaliação de fatores fisiográficos que interferem nos processos de auto-depuração de um córrego sub-tropical	278
Utilization of bacteria and fungi as indicators in the evaluation of physiographic factors that interfere in the self-depuration process in a subtropical stream	
Leite, O. da S.; Garcia, M.; Yano, T.; & Castro, A.F.P. de	
Detecção da adesina FY em amostras de <i>Escherichia coli</i> isoladas de bezerros com diarréia no Brasil	292
Detection of FY adhesin in strains of <i>Escherichia coli</i> isolated from calves with diarrhea in Brazil	
Liberal, M.H.T.	
Detecção de rebanhos bovinos portadores de micoplasmose através do isolamento de <i>Mycoplasma bovis</i> de exsudatos nasais de bezerros	296
Detection of mycoplasmoses carriers in bovine herds by the isolation of <i>Mycoplasma bovis</i> from calves' nasal exudates	
Filgueiras, A.L.L.; & Hofer, E.	
Ocorrência de <i>Campylobacter</i> termofílico em diferentes pontos de uma estação de tratamento de esgotos na cidade do Rio de Janeiro, RJ	303
Occurrence of thermophilic <i>Campylobacter</i> in different points of a sewage treatment station in Rio de Janeiro, R.J.	
Magalhães, M.; Magalhães, V.; Leão, G.C.; & Galvão, L.P.R.	
Susceptibilidade do <i>Campylobacter pylori</i> a nove agentes antimicrobianos	
Susceptibility of <i>Campylobacter pylori</i> to nine antimicrobial agents	309

Moreira, Y.K.; Reis, J.H.; & Rocha, O.A. Surto de cromomicose sistêmica em rãs (<i>Rana catesbeiana</i> , Shaw 1802), causado pelo <i>Cladosporium</i> sp., Minas Gerais, Brasil An outbreak of systemic chromomycosis in frogs (<i>Rana catesbeiana</i> , Shaw 1802) caused by <i>Cladosporium</i> sp	313
Campos-Takaki, G.M.; Dietrich, S.M.C.; & Manocha, M.S. Influência da idade da cultura na composição química da parede celular de <i>Ellisomyces anomalous</i> The influence of culture age on the chemical cell wall of <i>Ellisomyces anomalous</i>	321
Carvalho, A. de; Santiago, I. da S.T.; & Molinari, R. Produção de substâncias que absorvem luz ultravioleta por <i>Aspergillus oryzae</i> em meios complexos Production of UV light adsorbing substances by <i>Aspergillus oryzae</i> in complex media	327
Mendes, C.M.F.; Francisco, W.; Siqueira, L.F. de G. & Silveira, M.J. Sorogrupagem de <i>Cryptococcus neoformans</i> , nota epidemiológica <i>Cryptococcus neoformans</i> serogrouping, epidemiologic note	333
Resende, M.A. de; Franco, M.V.G.; & Hamdan, J.S. Metabolismo oxidativo de células leveduriformes de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i> Oxidative metabolism of yeast cells of <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	337
Corrêa, B.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Reche, N.O.C.; & Purchio, A. Aplicação do método fluorescente (solução de diacetato de fluoresceína e brometo de etídio) no estudo da viabilidade de <i>Metarrhizium anisopliae</i> Fluorescent method (fluorescein diacetate and ethidium bromide) for the viability study of <i>Metarrhizium anisopliae</i>	341
Ioneda, T.; Niigaki, N.T.; Almeida, E.T. de; & Levy, C.E. Micolato de trehalose: principal componente lipídico dotado de propriedade tóxica em nocardias isoladas de casos clínicos Occurrence of trehalose mycolate as the major lipidic component carrying toxic property in clinical nocardia isolates	345
Corrêa, B.; Purchio, A.; Gambale, W.; Paula, C.R.; Framil, V.M.S. Método fluorescente para estudo da viabilidade de células fúngicas em materiais clínicos Fluorescent method to study the viability of fungi cells in clinical materials	349
Oliveira, I.C. de; Kroon, E.G.; Ferreira, P.C.P.; & Golgher, R.R. Produção de interferon humano de membranas amnióticas em microtécnica Production of human amniotic interferon by microtechnique	358
Linhares, A.C. de; Mascarenhas, J.D.P.; Gabbay, Y.B.; Freitas, R.B. de A possible fifth human rotavirus serotype and an unusual serotype 2, subgroup II rotavirus strain	363
Zanin, G.M.; & Moraes, F.F. de Atividade e energia de ativação da amiloglicosidase na forma solúvel e imobilizada Activity and energy of activation of soluble and immobilized amyloglucosidase	367
Oliveira, E.G. de; & Morais, J.O.F. de Influência da taxa de diluição sobre a produtividade e a eficiência da fermentação alcoólica contínua com <i>Zymomonas mobilis</i> Influence of dilution rate on the productivity and yield of continuous alcoholic fermentation with <i>Zymomonas mobilis</i>	372

Giordano, R. de L.C.; & Schmidell, W.	
Estudo cinético da hidrólise enzimática de amido: inibição pela glicose	376
Kinetic study of starch enzymatic hydrolysis: glucose inhibition	
Leon, W.; & Barros, D.I.M.	
O ensino da microbiologia: Um desafio!	
Teaching microbiology: A challenge	382
Informação Técnico-Científica SBM	
	387

VOLUME 20 OUTUBRO-DEZEMBRO 1989 NÚMERO 4

Modolo, J.R.; Bisping, W. & Kirpal, G.	
Suscetibilidade "in vitro" de <i>Campylobacter</i> isolado de bezerros contra 22 antimicrobianos	391
"In vitro" drug susceptibilities of <i>Campylobacter</i> isolated from calves against 22 antimicrobial agents	
Caetano-Pisciottano, M.N.; Alves, A.J.; Simeon de Buochberg, M.; Attisso, M.; Zuccarelli, M. & Dusart, G.	
Atividade de três ureidopenicilinas sobre bacilos gram negativos isolados no Recife	396
Activity of three ureidepenicillins on Gram negative bacillus isolated in Recife	
Corrêa, I. & Hofling, J.F.	
Avaliação da ação antimicrobiana de dois desinfetantes hospitalares	402
Antimicrobial action evaluation of two Hospital disinfectants	
Zucato, M.R.L.; Castro, A.F.P. de; Ricci, L.C. & Costa M.G.	
Estudo em camundongos (CBA x C57B1/10) F1 da influência da enterotoxina termoestável (STa) de <i>Escherichia coli</i> na fagocitose	411
Study in mice (CBA x C57B1) F1 of the influence of thermostable (STa) enterotoxins from <i>Escherichia coli</i> in phagocytosis	
Rosado, A.S.; Silva, K.R.A. da; Rocha Seixas, R.L. da; Miguel, M.A.L. & Oliveira Tórtora, J.C. de	
Intoxicação por <i>Staphylococcus aureus</i> provocada por carne de peru defumada	419
Petri, C.M.; Antunes, L.A.F. & Saridakis, H.O.	
<i>Escherichia coli</i> em produtos cárneos comercializados em Londrina - PR. I - Frequência de <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica clássica (EPEC)	
<i>Escherichia coli</i> in meat products commercialized in Londrina - PR. I - Frequency of classical enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)	421
Petri, C.M.; Antunes, L.A.F. & Saridakis, H.O.	
<i>Escherichia coli</i> em produtos cárneos comercializados em Londrina - PR. II - Frequência de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigenicas (ETEC)	
<i>Escherichia coli</i> in meat products commercialized in Londrina - PR. II - Frequency of enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	427
Leite, C.Q.F.; Ferracini Júnior, R.; Falcão, D.P.; David, H. & Frébault, V.L.	
Prevalência e distribuição de micobactérias nas águas de algumas regiões do Estado de São Paulo - Brasil	
Prevalence and distribution of mycobacteria in water of some regions of São Paulo State - Brazil	432

Yanaguita, R.M.; Barbosa, A.D.; Silva, L.A. & Gilio, A.E. Emprego do método de co-aglutinação na detecção de enteroxina termolábil (LT) de <i>Escherichia coli</i> Use of co-agglutination test for detection of enterotoxin LT from <i>Escherichia coli</i>	442
Brito, M.E.F. de; Brasil, D.P.; Almeida, C.R. de & Almeida, A.M.P. de Emprego do teste de imunofluorescência no diagnóstico da peste (infecção pela <i>Yersinia pestis</i>) nos focos do Nordeste do Brasil Use of immunofluorescent antibody test in the plaque diagnosis in the foci of the Brazil	446
Nahas, E.; Assis, L.C. de & Zanon, J.C. Liberação das fosfatases ácida e alcalina repressíveis de <i>Neurospora crassa</i> por detergentes e sais Elution of repressible acid and alkaline phosphatases from <i>Neurospora crassa</i> by detergents and salts	452
Chaves, V.M.G.; Silva, D.O.; Brune, W. & Moreira, M.A. Atividades celulolíticas de <i>Humicola</i> sp Cellulolytic activities of <i>Humicola</i> sp	460
Pasqual, M.S.; Carrau, J.L. & Moyna, P. Estudos sobre a inibição seletiva de leveduras de uso enológico por alcalóides Studies on the use of alkaloids for the selective inhibition of wine yeasts	466
Chaves, V.M.G.; Silva, D.O.; Brune, W. & Moreira, M.A. Caracterização do fungo <i>Humicola</i> sp termo-celulolítico isolado de composto Caracterization of a thermophilic and cellulolytic <i>Humicola</i> sp isolated from compost	470
Carvalho, Y. & Milanez, A.I. Efeitos da temperatura e umidade do solo sobre <i>Pythium splendens</i> Effects of soil temperature and moisture on <i>Pythium splendens</i> Braun	477
Paula, C.R.; Purchio, A.; Gambale, W.; Corrêa, B. & Costa Pires, M.F. Aspectos biológicos das fases filamentosa e leveduriforme de <i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	483
Cury, A.E.; Sampaio, M.C.C.; Birman, E.G. & Paula, C.R. Atividade de anti-sépticos contra leveduras isoladas da cavidade oral de pacientes com câncer de boca antes e durante a radioterapia	490
Neto, E.A.; Pignatari, A.C.C.; Castelo Filho, A.; Colombo, A.L.; Longo, J.C. & Camargo, Z.P. Micetoma eumicótico: Relato de um caso por <i>Madurella grisea</i> Eumycotic mycetoma: Report of a case caused by <i>Madurella grisea</i>	495
Goldman, G.H.; Queiroz, M.V.; Costa, C. & Azevedo, J.L. de Isolamento, regeneração e condição nuclear em protoplastos de uma linhagem celulolítica de <i>Aspergillus niger</i> Isolation, regeneration and nuclear condition in protoplasts of a cellulolytic strain of <i>Aspergillus niger</i>	501
Informação Técnico-Científica SBM	507