

Revista de Microbiologia



SBM

REGINA T.
**Sociedade
Brasileira de
Microbiologia**

São Paulo — Brasil



Volume 21 Número 3 Jul. - Set. 1990

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Revista de Microbiologia (editada pela Sociedade Brasileira de Microbiologia) publica artigos originais, notas breves e ocasionalmente, revisões, abrangendo todos os aspectos da Microbiologia. Um artigo original é uma contribuição substancial a um assunto; a nota breve é um achado restrito de uma descoberta nova e significante e uma revisão é um apanhado crítico feito por um especialista que já tenha se destacado no assunto da revisão.

Todos os trabalhos submetidos devem ser escritos em português ou preferencialmente, em inglês. A decisão de aceitar o manuscrito é feita por um corpo de Revisores.

A submissão de um trabalho a esta Revista implica que o mesmo não foi previamente publicado e nem foi enviado concomitante para publicação em outra revista.

ORGANIZAÇÃO E FORMATO DOS MANUSCRITOS: Datilografic com espaço duplo, deixando margens de 2,0 cm e as páginas devem ser numeradas sequencialmente. Os artigos originais estão restritos a um máximo de 15 páginas impressas incluindo figuras e tabelas (isto corresponde a aproximadamente 25 páginas datilografadas). A primeira página deve incluir o título, nome(s) do(s) autor(es), instituição e endereço completo do(s) autor(es). Três a cinco palavras chaves devem ser incluídas. O artigo deve ser dividido em: Resumo e Summary, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências Bibliográficas. Resultados e Discussão podem ser combinados num título só. O Resumo deve conter no máximo 250 palavras, mas se o artigo for redigido em português, o Summary (Resumo) deve ser mais extenso, 300 palavras no mínimo.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB e as medidas, o sistema métrico.

Cite cada referência por número, no texto. As referências deverão ser numeradas e ordenadas alfabeticamente, de acordo com os exemplos abaixo:

Ingram, L.O. & Conway, T. – Expression of different levels of the ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 54:397-404, 1988.

Fleming, H.P. – Fermented Vegetables. – In: Rose, A.H., ed. – Economic Microbiology. London, Academic Press, p. 228-258, 1982.

Krieg, N.R. & Holt, J.C., eds. – Bergey's manual of systematic bacteriology. Baltimore, Williams & Wilkins, v. 1, 1984.

Somente aquelas fotografias que são estritamente necessárias para o entendimento do trabalho é que devem ser incluídas. O material utilizado para este fim deve ser de qualidade suficientemente boa para assegurar boa reprodução. Devem ser numeradas no verso, a lápis e identificadas com o nome dos autores. As legendas de gráficos e tabelas devem ser datilografadas em folhas separadas. Gráficos, figuras e tabelas devem ser apresentados de tal forma que possam ser reduzidos, se necessário. Não são aceitas ilustrações coloridas. Indicar no texto o local aproximado onde devem ser inseridos tabelas, figuras e gráficos.

As Notas devem conter no máximo seis páginas datilografadas. Devem ser escritas de acordo com as instruções dadas acima, porém sem as divisões em capítulos e o resumo não deve exceder 50 palavras. Figuras ou tabelas estão restritas a duas, no máximo, podendo no entanto ser uma tabela e uma figura.

As Revisões devem ser de assuntos amplos e de interesse geral. Somente especialistas devem apresentar este tipo de publicação. Além do Resumo, pode conter um índice do conteúdo da revisão.

Uma vez aceito o trabalho, uma prova tipográfica será remetida ao autor principal a fim de corrigir os erros. As provas devem ser devolvidas no prazo máximo de dez dias. Em caso de atraso, as provas serão corrigidas pelos editores e publicadas. Modificações que impliquem em recomposição do texto não serão permitidas.

Quinze separatas de cada artigo serão fornecidas gratuitamente. Cópias adicionais poderão ser requisitadas mas os Autores deverão pagá-las.

Os artigos deverão ser remetidos em triplicata e enviados para o Diretor Executivo.

Revista de Microbiologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cidade Universitária – USP
05508 – São Paulo – SP – Brasil



Regina Toledo

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Filiado à IUMS — INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES

Diretor Executivo: FLÁVIO ALTERTHUM

Conselho Editorial

Adauto Ivo Milanez	José Alberto Neves Candeias
Alcides Serzedello	Leda Cristina Santana Mendonça Hagler
Allen Norton Hagler	Leon Rabinovitch
Ana Clara G. Schenberg	Luiz Rachid Trabulsi
Andrejus Korolkovas	Marcelo Magalhães
Antonio Fernando Pestana de Castra	Maria Aparecida Shikanai Yasuda
Aramis Augusto Pinto	Maria Lucia B.O. Rácz
Arlete Emily Cury	Maria Regina Fernandes Toledo
Astrea Mennucci Giesbrecht	Maria Therezinha Martins
Augusto Cezar Montelli	Mauro Faber de Freitas Leilão
Caio Marcio Figueiredo Mendes	Milton de Uzeda
Carlos da Silva Lacaz	Myrna Sabino
Carmo Elias A. Melles	Moacyr Alcojarado Rebello
Celeste Fava Netto	Paulo Hidoki Yasuda
Claudete Rodrigues Paula	Paulo Suyoshi Minami
Daison Olzany Silva	Romain Rolland Golgher
Edmar Chartone de Souza	Sebastião Timo Iaria
Ernesto Hofer	Sérgio Olavo Pinto da Costa
Flavio Alterthum	Sérgio Eduardo Longo Fracallanza
Galba Maria Campos Takaki	Silvio Arruda Vasconcelos
Hermann Gonçalves Schatzmayer	Sumie Hoshino Shimizu
Homero Fonseca	Vera Lucia Garcia Calich
Ises de Almeida Abrahanson	Waldemar Francisco
João Lúcio de Azevedo	Walderez Gambale
Johanna Dobereiner	Willibaldo Schmidell Netto
	Zoilo Pires Camargo

Secretaria Executiva: Maria Helena Colón Silva

Os artigos publicados na Revista de Microbiologia são indexados em: Current Contents (USA); CNRS - Centre National de la Recherche Scientifique (França); Chemical Abstracts Service (USA); Cambridge Scientific Abstract (USA); Commonwealth Mycological Institute (England); Hamdard National Foundation (Paquistão); IMLA - Index Medicus Latino Americano (Brasil); Institut Nauknoi Informatsii (URSS); Periodica (México); Sumarios Correntes Brasileiros; UMI - University Microfilms International (USA).

Auxílio Financeiro: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); FINEP.

Produzido pela TEC art Editora: fone (011)255-7531.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
AV. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508 - São Paulo - S.P.
Brasil
Fone (011) 813-9647
TELEX 11 35085
FAX 88 79875

REVISTA DE MICROBIOLOGIA - SBM
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
Cid. Universitária - USP
05508-900 — São Paulo/SP

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Filiada a IUMS - INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES

Diretoria	Presidente Maria Therezinha Martins Inst. de Ciências Biomédicas - USP Dept.º de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP	Vice-Presidente Walderez Gambale Inst. de Ciências Biomédicas - USP Dept.º de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 05508 - São Paulo - SP
	Secretaria 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. Fac. de Ciências Farmacêuticas - USP Conjunto das Químicas Cidade Universitária 05508 - São Paulo - SP
Conselho Fiscal	Paulo S. Minami (FCF/USP) Claudete R. Paula (ICB/USP) Sebastião Timo Laria (ICB/USP)	
Coordenadores de Programas da SBM	Microbiologia de Alimentos (Sebastião Timo 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); Microbiologia de Solo (Ely Nahas - UNESP - Jaboticabal - SP); Micologia (Benedito Corrêa - ICB/USP-SP); Micotoxinas (Mirna Sabino - IAL-SP); Infecções Hospitalares (Carlos Emílio Levy - FMRP/USP). Taxonomia - Coleções de Cultura (Vanderley P. Canhos - UNICAMP-SP)	
Objetivos	A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio, 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 FAX 8879875	

EDITORIAL

Espero que os colegas estejam apreciando as mudanças introduzidas na Revista de Microbiologia a partir do primeiro número de 90. Incentivo-os a submeterem seus trabalhos, redigindo-os em língua inglesa. Como já salientamos, o objetivo é aumentar a divulgação de nossas pesquisas, no exterior.

A sistemática adotada ao receber um trabalho é a seguinte: o trabalho é lido pelo Diretor Executivo a fim de inteirar-se do assunto e indicar dois revisores. Enviamos a estes, os trabalhos e pedimos que não demorem mais do que 2-3 semanas para fazer a avaliação e anexamos, a título de sugestões, os seguintes tópicos que poderão servir de orientação no julgamento do trabalho:

I. Avaliação do conteúdo

- a) É matéria nova e vale a pena ser publicada na Revista?
- b) A apresentação é clara e lógica?
- c) As conclusões são justificadas pelas evidências apresentadas?
- d) O trabalho poderia ser diminuído sem interferir com o seu valor?
- e) Os gráficos e tabelas foram preparados de maneira clara e concisa?
- f) As ilustrações são adequadas? Excessivas? Devidamente explicadas? Vale a pena serem publicadas?
- g) Os resultados estão interpretados logicamente? Qual o propósito do trabalho? Que questões foram feitas e quais as respostas encontradas? Qual o significado das conclusões obtidas? As respostas obtidas têm alguma relação com o objetivo inicial?

II. Avaliação do valor comunicativo

- a) Título: deve ser informativo e conciso e conter "palavras chaves" para os trabalhos de indexação.
- b) Sumário: deve ser imenso e conter apenas as informações sobre os aspectos essenciais encontrados e as conclusões obtidas.
- c) Introdução: deve estabelecer o objetivo do trabalho de maneira sintética e clara, dando a situação das contribuições anteriores relacionadas ao problema.
- d) Métodos: deve conter detalhes ou referências suficientes para que outros possam repetir o trabalho.
- e) Resultados: deve apresentar o trabalho de maneira lúcida. Gráficos e tabelas não devem repetir detalhes do texto.
- f) Discussão: não deve ser simples revisão do trabalho, mas apresentar as conclusões e implicações resultantes.
- g) Estilo: é prerrogativa do autor, mas não deve criar conflito com a clareza e com os pontos acima apresentados.

Os dois pareceres são analisados pelo Diretor Executivo que determina uma das seguintes alternativas: 1- quando dois pareceres são favoráveis e não há sugestões a serem feitas, o trabalho está aceito para publicação; 2- quando o trabalho é aceito, mas há sugestões dos revisores, o trabalho é devolvido ao Autor com os pareceres e respectivas cópias corrigidas, para atender (ou não) as sugestões formuladas; 3- quando o trabalho é aceito para publicação por um revisor e recusado por outro, o Diretor

Reis, J. H.; Moreira, Y. K.; Nogueira, M. G. A.; Moreira, E. C. Leveduras associadas à porção terminal do intestino grosso de <i>Rana catesbeiana</i> , Shaw (1802), em diferentes fases de crescimento Yeast associated with the terminal portion of large intestine of <i>Rana catesbeiana</i> , Shaw (1802), at different growth stage.....	254
Pires, M. F. C.; Assis, C. M. de; Szeszs, M. W.; Pukinskas, S. R. B. S.; Giudice, M. C.; Paula, C. R.; Purchio, A. <i>Rhodotorula rubra</i> em cabelos humanos simulando quadro de piedra blanca Similar white piedra by <i>Rhodotorula rubra</i>	262
Mcknight, I. C. S.; Leitão, M. F. F.; Leitão, R. F. F. <i>Bacillus cereus</i> em macarrões industrializados. II. Ocorrência em produtos comerciais e sua multiplicação no alimento preparado para consumo <i>Bacillus cereus</i> in macaroni. II. Occurrence in commercial products and evaluation of its behavior in the prepared food.....	268
Borges, M. F. B.; Brandão, S. C. C.; Pinheiro, A. J. R. Sobrevivência de <i>Salmonella</i> spp em queijo Minas Padronizado durante a maturação Survival of <i>Salmonella</i> in standard Minas cheese during maturation.....	276
Alvarez, D. P.; Luque, A. G. Patogenicidad de cepas de <i>Microsporum fulvum</i> , aisladas de suelos tratados con herbicidas Pathogenicity of <i>Microsporum fulvum</i> , isolated from soil treated with herbicides.....	282
Neirotti, E.; Tanaka, Y.; Azevedo, J. L. de Formação de esferoplastos em <i>Humicola</i> sp Sphaeroplast formation process in the fungus <i>Humicola</i> sp.....	287
Domingues, R. M. C.; Coutinho, S. P.; Ferreira, M. C. S. Aderência de cepas de <i>Bacteroides fragilis</i> a cultura de célula primária Adherence of <i>Bacteroides fragilis</i> strains to a primary cell culture.....	290
Informações Técnico-Científicas (SBM)	293

EVALUATION OF DIFFERENT PLASMID DNA EXTRACTION METHODS IN THE MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *YERSINIA PESTIS* STRAINS.

Nilma Cintra Leal*
Alzira Maria Paiva de Almeida*
Luis Carlos de Souza Ferreira**

SUMMARY

Nine widely used techniques for the isolation of plamid DNA of gram-negative bacteria were applied to the *Yersinia pestis* EV76 laboratory strain and four clinical isolates. The procedure described by Casse et al. (9) was the only method able to isolate *Y. pestis* plasmids in a reproducible and efficient way. All strains analysed harboured four plasmids with Mr of 60, 44, 14, 9 and 6,4 MDal. The potential use of plasmid fingerprinting in epidemiologic studies of *Y. pestis* is discussed.

INTRODUCTION

Since some years ago, determination of the number and size of different molecular species of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis, associated or not with restriction endonuclease cleavage, represents an useful epidemiological approach to gram-negative and gram-positive bacteria (10, 19, 28, 30).

Plasmid profiles or, the so called, plasmid fingerprints, unlike other characterization methods as phagotyping, serotyping and biotyping can be used to identify epidemic bacterial strains or species carrying one or more plasmids involved in the expression of virulence-associated factors as production of pili, toxins, outer membrane proteins and resistance to antimicrobials (13, 20, 29).

Several simple and fast plasmid DNA isolation protocols were developed to *Escherichia coli* and most of them were applied to a wide variety to gram-negative bacilli (7, 9, 12, 14, 15, 18, 26, 27).

Yersinia pestis, the causative agent of bubonic plague, was believed to be a plasmid free bacterial species until the isolation of plasmids involved with virulence-associated factors (6, 11, 22). Since that time many publications reported the isolation and characterization of the virulence-associated 40-45 MDal plasmid found also in other species of the genus *Yersinia* (8, 23, 25). Most of these data were related to plasmids of a few widespread laboratory strains and the number of different plasmids found varied from one to five (6, 11, 22, 31). However, a more widespread use of plasmid analysis techniques in the epidemiologic characterization

* Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Fundação Oswaldo Cruz Av. Moraes Rego, s/nº - Caixa Postal 7472 Recife PE - 50.730

** Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami and Departamento de Biofísica e Radiobiologia Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária Recife PE - 50.730 Brazil
Corresponding author.

Present address: Dr. L. C. S. Ferreira, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Cidade Universitária - Ilha do Fundão 21949-Rio de Janeiro
Research supported by the Japanese International Cooperation Agency and CNPq.

of wild *Y. pestis* strains was hindered by the usual refractile behaviour of such isolates to standard plasmid isolation procedures.

In this work, we present data concerning the application of plasmid DNA isolation techniques to a laboratory strain and to some wild isolates of *Y. pestis*. Only one technique among nine different procedures was adequate for the efficient *Y. pestis* plasmid DNA isolation.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

Y. pestis strains used in this work are listed in Table 1. The pathogenic *Y. pestis* isolates were isolated from human cases in Northeast Brazil as previously described (1, 2, 3).

Table 1 — *Y. pestis* strains and their source.

Symbols: a — virulence associated factors:			
F1	— production of F1 antigen;		
Pfc	— production of pesticin, fibrinolysin and coagulase;		
Vwa	— production of V and W antigens;		
Pgm	— Ability to adsorb exogenous pigments;		
Vir	— virulent to mice and guinea pigs;		

Strain	Phenotype ^a	Reference
P.PB 862	F1 ⁺ , Pfc ⁺ , Vwa ⁺ , Pgm ⁺ , Vir ⁺	3
P.EXU 196	F1 ⁺ , Pfc ⁺ , Vwa ⁺ , Pgm ⁺ , Vir ⁺	1
P.EXU 795	F1 ⁺ , Pfc ⁺ , Vwa ⁺ , Pgm ⁺ , Vir ⁺	1
P.BA 03	F1 ⁺ , Pfc ⁺ , Vwa ⁺ , Pgm ⁺ , Vir ⁺	2
EV76	F1 ⁺ , Pfc ⁺ , Vwa ⁺ , Pgm ⁻ , Vir ⁻	11

Growth conditions

All strains were cultivated in YT medium (1% tryptone, 0,5% yeast extract, 0,5% sodium chloride, pH 7.4-7.6) overnight, with agitation, at 28°C.

Determination of virulence-associated factors

Production of F1 antigen (F1); production of pesticin, fibrinolysin and coagulase (Pfc); synthesis of V and W antigens (Vwa); ability to adsorb Congo Red (Pgm) and virulence to mice and guinea pigs (Vir) were carried out as previ-

ously described (1, 5).

Isolation of plasmid DNA

Nine different simplified small scale plasmid DNA isolation procedures were used as described by the authors and, are briefly described below:

— Birnboim & Doly (7) — overnight grown cells were harvested by centrifugation, resuspended in lysozyme containing buffer (50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0 and lysozyme 2mg/ml) incubated 30 min at 0°C followed by the addition of alkaline solution (1% SDS and 0.2 N NaOH). The mixture was incubated at room temperature for 10 min, then the neutralizing solution (sodium acetate 3M pH 4.8) was added and the mixture was kept in ice for 1h. After centrifugation the supernatant was saved and ethanol precipitated.

— Kieser — overnight grown cells were harvested by centrifugation, resuspended in lysozyme containing buffer (0.3 M sucrose, 25 mM EDTA; 25 mM Tris-HCl pH 8.0 and 2 mg/ml lysozyme), incubated at 37°C for 30 min, followed by the addition of alkaline solution (and 0.3 N NaOH and 2% SDS) and incubation at 70°C for 30 min. Then a neutralizing solution (phenol: chlorophorm, 1:1) was added and the mixture was centrifuged. The supernatant was saved and ethanol precipitated.

— Riggs & McLachlan (27) — overnight grown cells were harvested by centrifugation resuspended in lysozyme containing buffer (8% sucrose, 50 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5% Triton X-100 and 70 ug/ml lysozyme). The mixture was incubated 40 seconds in boiling water and centrifuged. The supernatant was saved and ethanol precipitated.

— Kado & Liu (14) — overnight grown cells were harvested by centrifugation and resuspended in the lysing solution (3% SDS, 50 mM Tris-NaOH, pH 12.6). The mixture was kept at 65°C for 20 min and two volumes of phenol:chlorophorm (1:1) was added. Plasmid DNA was obtained after centrifugation and ethanol precipitation of the supernatant.

— Phuler & Timmis (26) — overnight grown cells were harvested by centrifugation and resuspended in buffer (20% sucrose, 40 mM Tris-HCl, pH 7.5) at 0°C for 10 min. Lysosyme was added

(2mg/ml, final concentration) and incubated for additional 10 min. Then, lysing buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0 10 mM EDTA, 1% TritonX-100) was added and the mixture was centrifuged. The supernatant was saved and treated with TE saturated phenol. The aqueous phase was recovered, and adjusted to 0.5 N NaCl and phenol treated. The suspension was centrifuged, the supernatant saved and ethanol precipitate.

— Maniatis et al (18) — overnight grown cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysozyme containing buffer (50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA and 2 mg/ml lysozyme) and incubated at 0°C for 10 minutes. Then a lysing solution (1% SDS and 0.2 N NaOH) was added, followed by the incorporation of 5M potassium acetate (pH 4.8). The tubes were kept in ice for 15 minutes and centrifuged. The supernatant was saved and ethanol precipitate.

— Holmes & Quigley (12) — overnight grown cells were harvested by centrifugation and resuspended in lysozyme containing buffer (8% sucrose, 50 mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0, and 2 mg/ml lysozyme) and incubated in ice for 15 minutes. Lysing solution (8% sucrose, 50 mM EDTA, 50mM Tris-HCl pH 8.0 and 10% Triton X - 100) was added and the mixture was kept in boiling water for 50 seconds, followed by the addition of NaCl (500mM) in 50 mM Tris-HCl. Then, the tubes were centrifuged, the supernatant was saved and treated with phenol-chlorophorm (1:1). After an additional centrifugation the supernatant was saved and ethanol precipitated.

— Tsukano et al., (31) — overnight grown cells were harvested by centrifugation and washed for 1 hour with 2.5% NaCl at 4°C. Cells were centrifuged and resuspended in lysozyme containing buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 70 mM EDTA, 25% sucrose and 150 ug/ml lysozyme) for 10 minutes in ice. SDS was added to a final concentration of 0.5%, the mixture was incubated at 37°C for 10 min, centrifuged and the supernatant was saved. Dithiotreitol, NaCl and 2-mercapto-ethanol were added to final concentration of 10 mM, 1 N and 10 mM, respectively, and the tubes were kept in ice for 24 hours. After centrifugation the supernatant was saved and ethanol precipitated.

— Casse et al. (9) — Sodium chloride (1N) was incorporated to overnight cultures and agitated for 30 min at 28°C. Then the cells were harvested by

centrifugation, washed twice with TE buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0 and 10 mM EDTA) and resuspended in lysing buffer (1% SDS in TE buffer, pH 12.4) for 30 min at room temperature. Then 2 M Tris-HCl pH 7.0 was added to the mixture followed by NaCl, adjusted to 3%, and a phenol-chlorophorm (1:1) treatment. After centrifugation the supernatant was saved and ethanol precipitated.

Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA

DNA samples were diluted in sample buffer (0.25% xylene cyanol, 0.25% bromophenol blue, 25% Ficoll) and electrophoresed in horizontal agarose submarine gels (12 cm x 6 cm x 0.5 cm) with phosphate running buffer (80 mM Tris-phosphate, 8 mM EDTA, pH 8.0) at 100V for approximately 5 hours. Ethidium bromide (0.5 ug/ml) was added to gels and running buffer. DNA bands were visualized under UV illumination and photographed with Kodac Panatomic-X film with a red filter.

RESULTS

Table 2 lists the efficacies of different plasmid DNA isolation methods in relation to the *Y. pestis* EV76 strain. No plasmid DNA could be detected with seven plasmid isolation techniques used in mini preparation scale. The procedure described by Birnboim & Doly (7) and Casse et al. (9) were the only techniques which allowed the visualization of distinct plasmid DNA bands in agarose gels. Four distinct plasmids with molecular weight of 60, 44, 14.9 and 6.4 MDal were detected when the *Y. pestis* EV 76 strain was subjected to both plasmid DNA extraction methods. However, the method described by Birnboim & Doly (7) resulted in intense degradation, smears running along with the DNA bands. Frequently, the 60 MDal and the 14.9 MDal could not be observed in plasmid preparations of the EV76 strain when this method was used. On the other hand, the procedure described by Casse et al. (9) resulted in faint but clear DNA bands corresponding to 4 plasmid species. To increase the plasmid DNA yield with this method, increased medium scale extractions (50 ml overnight cultures) were carried out. Excellent results were obtained with clear and concentrated DNA bands. All four plasmids of the EV76 strains were reproducible and efficiently isolated in several

Table 2 - Isolation of plasmid DNA of the *Y pestis* EV76 strains by nine different techniques.

Symbols:	a -	Plasmid content of <i>Y pestis</i> EV76: 60, 44, 14, 9 and 6.4 MDal
- =		no visible plasmidial band
+ =		four plasmid isolated, frequent loss of 60 MDal and 14.9 MDal plasmids, contamination with degraded DNA (smear)
++ =		four plasmids isolated, faint bands in minipreps, higher yields in medium scale preparation (50 ml), no contamination with degraded DNA.

Technique	Recovery of <i>Y pestis</i> EV76 plasmid DNA ^a
1 — Keiser (15)	—
2 — Riggs and McLacklan (27)	—
3 — Kado and Liu (14)	—
4 — Puhler and Timmis (26)	—
5 — Maniatis et al. (18)	—
6 — Holmes and Quigley (12)	—
7 — Tsukano et al. (31)	—
8 — Birnboim and Doly (7)	+
9 — Casse et al. (9)	++

independent experiments (data not shown).

Four wild *Y pestis* strains isolated from infected persons in Northeast Brazil were subjected to the plasmid isolation procedure described by Casse et al. (9). A set of four plasmids with the same molecular weights of the EV76 strain plasmids was found in all four isolates analysed (Figure 1).

DISCUSSION

Plasmid analysis is a useful method for epidemiologic typing of a variety of microorganisms. In outbreaks, plasmid profiling is a rapid, convenient way to follow the spread of epidemic strain and may be more specific than other typing methods (29).

Initially, the isolation of plasmid DNA required liters of bacterial broth culture and relied on sophisticated ultracentrifugation techniques. In the 1970s, more rapid methods of partially purified plasmid DNA required 60-100 ml of bacterial culture and several days of work (21). Today, plasmid DNA can be isolated from 0.5 ml of an overnight

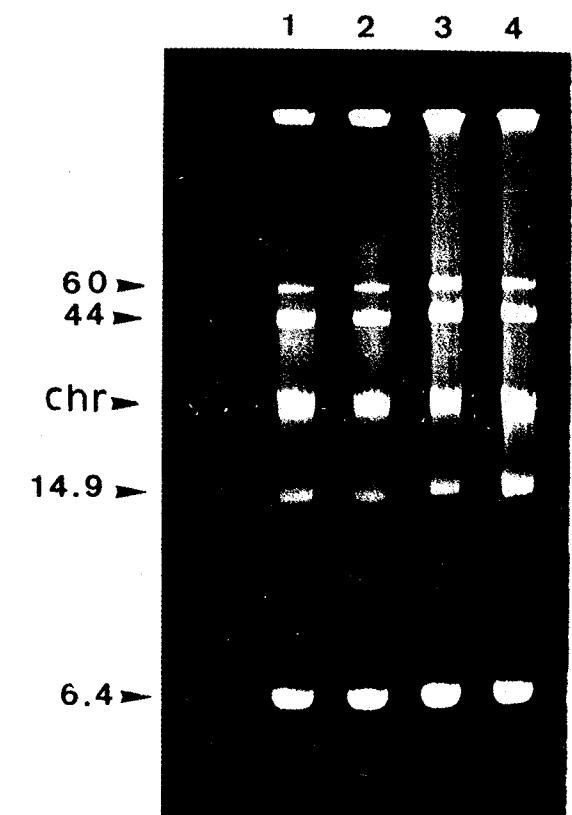


Figure 1 — Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA isolated from *Yersinia pestis* strains by the method of Casse et al. (9). 1 - P.PB 862, 2 - P.EXU 196, 3 - P.EXU 795, 4 - P.Ba 03. Molecular weights are indicated on the left side of the figure.

bacterial growth culture in 4 hours (7, 12, 14, 15, 18). The bacterial envelope is removed by treatment with EDTA and lysosyme, inner membrane is disrupted with detergent and the chromosome is denatured at alkaline pH, associated or not with cellular debris removal by centrifugation and phenol treatment followed by plasmid DNA recovery and ethanol precipitation. Such basic protocol has been successfully used for the isolation of plasmid DNA from most genera and species of Enterobacteriaceae (19, 32).

Unfortunately, some bacterial species, as *Y pestis*, proved to be quite resistant to plasmid DNA isolation by standard procedures. Initially, *Y pestis* was reported to lack any detectable plasmid (17). Later, three groups manage to isolate plasmids from *Y pestis* (6, 11, 22). Ferber and Brubaker (11) were able to visualize three different plasmids with Mr of 65 MDal, 45 MDal, and 6

MDal associated with the production of pesticin (*Pst+*) and VW antigens (*Vwa+*) using the technique described by Casse et al. (9). Ben-Gurion and Schafferman (6) found also three distinct plasmid species (12.5, 44.4 and 61 MDal) using a cleared lysate derived plasmid isolation method, whereas Portnoy and Falkow (22) could identify only the VW antigen coding plasmid using also a cleared lysate plasmid isolation method.

Our results corroborate the data of Ferber and Brubaker (22) regarding the excellent results obtained with the technique of Casse et al. (9) for the isolation of plasmid DNA from *Y. pestis*. Unfortunately, our attempts to apply simplified versions of the cleared lysate techniques, as the procedures described by Puhler and Timmis (26) and Tsukano et al. (31), were disappointing. Probably, such techniques could offer better results when larger volumes are used followed by additional ultracentrifugation steps in cesium chloride gradients. Since such alternatives would invalidate any epidemiological analysis, where many samples must be processed in a short period, we did not investigated such possibilities.

Curiously, the technique described by Tsukano et al. (31) gave excellent results with a different laboratory strain and five distinctive plasmids were found, including the 13-15 MDal plasmid associated with the production of F1 antigen. In our hands, this technique could not be reproduced in large, medium or small scales and no reason could be found to explain such results.

Based on the present results, we recommended the technique described by Casse et al. (9) as the best alternative for the efficient and reproducible plasmid DNA isolation of *Y. pestis*. This protocol proved to be rather simple and fast, allowing many samples to be processed at the same time. However, the best results were always obtained with medium scale preparations (50 ml). The reason for such difference is not clear but seems to be a general characteristic of this technique irrespective of the bacterial strain used (unpublished observation).

Y. pestis is a remarkable conserved and stable bacterial group in relation to biotyping, phagotyping, antibiotic resistance and outer membrane protein patterns (4, 5). Preliminary observations in a plague outbreak in Northeast Brazil indicated the uniform plasmid content of the strains isolated (16). However, a better evaluation of the potential use of molecular plasmid analysis in epidemiological studies of *Y. pestis* is still unknown. Additional studies should be carried out with higher numbers of *Y. pestis* wild isolates to

correctly evaluate the usefulness of plasmid fingerprinting in the characterization of this organism.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the skilful technical assistance of Mr. Severino Humberto Almeida and Mrs Yara Nakasawa.

RESUMO

Avaliação de diferentes métodos para extração de DNA plasmidial para caracterização de cepas de *Yersinia pestis*

Nove técnicas amplamente empregadas no isolamento de DNA plasmidiano de bactérias gram-negativas foram aplicadas na linhagem de laboratório EV76 e quatro isolamentos clínicos de *Yersinia pestis*. O procedimento descrito por Casse et al. (1979) foi o único método capaz de isolar os plasmídios de *Y. pestis* de forma eficiente e reproduzível. Todas as linhagens analisadas apresentaram quatro plasmídeos com Mr de 60, 44, 14,9 e 6,4 MDal. O uso em potencial da determinação do padrão plasmidiano em estudos epidemiológicos de *Y. pestis* é discutido.

REFERENCES

1. Almeida, A. M. P.; Brasil, D. P.; Carvalho, F. G. & Almeida, C. R. - Isolamento da *Yersinia pestis* nos focos pestosos do Nordeste do Brasil no período de 1966 a 1982. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 27:207-218, 1985.
2. Almeida, A. M. P.; Brasil, D. P.; Mélo, M. E. B.; Leal, N. C. & Almeida, C. R. - Detecção da peste no Estado da Bahia, Brasil. *Rev. Microbiol. São Paulo*, 16:231-233, 1985.
3. Almeida, A. M. P.; Brasil, D. P.; Leal, N. C.; Mélo, M. E. B.; Rêgo, R. V. B. & Almeida C. R. Estudos bacteriológicos e sorológicos de um surto de peste no Estado do Pará, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 84:249-256, 1989.
4. Abath, F. G. C.; Almeida, A. M. P. & Ferreira, L. C. S.; - Eletrophoretic characterization of the outer membrane proteins of *Yersinia pestis* isolated in Northeast Brazil. *Epidemiol. Infect.*, 103:592-602, 1989.
5. Bahmanyar, M. & Cavanaugh, D. C. *Plague Manual*. Genève, World Health Organization. 77p. 1976
6. Ben-Gurion; R. & Shafferman, A., - Essential virulence determinants of different *Yersinia* species are carried on a common plasmid. *Plasmid*, 5:183-187, 1981.

7. Birnboim, H. C. & Doly, J., - A rapid alkaline procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 6:1513-1523, 1979.
8. Bolin, I. Portnoy, D. A. & Wolf-Watz, H. - Expression of temperature-inducible outer membrane proteins of *Yersinia*. *Infect. Immun.*, 48:234-240, 1985.
9. Casse, F.; Boucher, C.; Julliot, J. S.; Michel, M. & Denaire, J., - Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, 113:229-242, 1979.
10. Farrar Jr., W. E. - Molecular analysis of plasmids in epidemiological investigation. *J. Infect. Dis.* 148:1-6, 1983.
11. Ferber, D. M. & Brubaker, R. R., - Plasmids in *Yersinia pestis*. *Infec. Immun.*, 31:839-841, 1981.
12. Holmes, D. S. & Quigley, M., - A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmid. *Anal. Biochem.*, 114:193-197, 1981.
13. John, J. F.Jr. & Twitty, J. A., - Plasmids as epidemiological markers in nosocomial gram-negative bacilli: experience at a university and review of the literature. *Rev. Infect. Dis.*, 8:693-704, 1986.
14. Kado, C. I. & Liu, S. T., - Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol.*, 145:1365-1373, 1981.
15. Kieser, T., - Factors affecting the isolation of DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid*, 12:19-36, 1984.
16. Leal, N. C.; Almeida, A. M. P. and Ferreira, L. C. S., - Plasmid composition and virulence-associated factors of *Yersinia pestis* isolates from a plague outbreak at the Paraíba State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 31:295-300, 1989.
17. Little, R. V. & Brubaker, R. R., - Characterization of deoxyribonucleic acid from *Yersinia pestis* by ethidium bromide-cesium chloride density gradient centrifugation. *Infect. Immun.*, 5:630-631, 1972.
18. Maniatis, T.; Fritsch, E. F. & Sambrook, J., - *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. 545p., 1982.
19. Mayer, L. W., - Use of plasmid profiles in epidemiologic surveillance of disease outbreaks and in tracing the transmission of antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Reviews*, 1:228-243, 1988.
20. Medina, M. C.; Gonzalez, A.J. ; Mendez, F. J. & Hardisson, C., - Plasmid typing of *Shigella sonnei* epidemic strains and molecular relationship of their R-plasmids. *Eur. J. Epidemiol.*, 4:158-163, 1988.
21. Meyers, J. A.; Sanchez, D.; Elwell, L. P. & Falkow, S., - Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.*, 127:1529-1537, 1976.
22. Portnoy, D. A. & Falkow, S., - Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.*, 148:877-883, 1981.
23. Portnoy, D. A.; Blanck, H. F. Kingsbury, D. T. & Falkow - Genetic analysis of essential plasmid determinants of pathogenicity in *Yersinia pestis*. *J. Infect. Dis.* 148:297-304, 1983.
24. Portnoy, D. A.; Wolf-Watz, H.; Bolin, I. Beeder, A. B. & Falkow, S., - Characterization of common virulence plasmids in *Yersinia* species and their role in the expression of outer membrane proteins. *Infect. Immun.*, 43:108-114, 1984.
25. Portnoy, D. A. & Martinez, R. J., - Role of plasmid in the pathogenicity of *Yersinia pestis*. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.*, 118:29-51, 1985.
26. Puhler, A. & Timmis, K. N., - Advanced Molecular Genetics New York, Berlin Heidelberg, Tokyo, Springer-Verlag. 1984.
27. Riggs, M. C. & McLachlan, A., - A simplified scanning procedure for large numbers of plasmid mini-preparations. *Biotechniques*, 4:310-312, 1986.
28. Schaberg, D. R.; Tomphins, L. S. & Falkow, S., - Use of agarose gel electrophoresis of plasmid deoxyribonucleic acid to fingerprint gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.*, 13:1105-1108, 1981.
29. Shlaes, D. M. & Currie McCumber, C. A., - Plasmid analysis in molecular epidemiology: a summary and future decisions. *Rev. Infect. Dis.*, 8:738-746, 1986.
30. Thompson, R.; Hughes, S. G. & Broda, P., Plasmid identification using specific endonucleases. *Mol. Gen. Genet.*, 133:141-149, 1974.
31. Tsukano, H.; Nake, A. & Sakakibara, Y., - Plasmid-like properties of the four virulence-associated factors of *Yersinia pestis*. *Microbiol. Immunol.*, 30:837-848, 1986.
32. Wachsmuth, K., - Molecular epidemiology of bacterial infections examples of methodology and of investigations of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.*, 8:682-692, 1986.

Recebido para publicação em 7/12/89

AFLATOXICOSE EM CUNICULTURA DE LONDRINA, PR.

Elisa Y. Hirooka¹
Yuko Yoshimoto¹
Eduardo Vicente¹
Ricardo A. Ugolini²
Nilda M. B. Vanzella²
José R. Menezes³
Lúcia M. V. Soares⁴

RESUMO

No período de dezembro de 1986 a abril de 1987, a ocorrência de aflatoxicose causou a morte de 560 coelhos na região de Londrina - Paraná. Para a diagnose do problema foram analisadas 6 amostras de ração coletadas em diferentes propriedades. A presença de aflatoxina B₁ foi detectada em uma amostra de triguilho na concentração de 33 µg/kg, duas amostras de ração granulada na concentração de 110 e 44 µg/kg, e a contagem total de bolores foi de $8,2 \times 10^6$; $2,8 \times 10^6$ e $8,0 \times 10^3$ UFC/G, respectivamente. Na amostra de triguilho predominou *Aspergillus flavus* com $6,7 \times 10^6$ UFC/g, enquanto que nas amostras de ração granulada predominou *A. flaviceps*. A presença de aflatoxina B₁ e ausência de *A. flavus* na ração granulada, indica que o tratamento térmico pode ter eliminado o fungo, mas não inativou a toxina.

INTRODUÇÃO

Aflatoxinas são metabólicos tóxicos produzidos por certas linhagens de *Aspergillus flavus* Link e *Aspergillus parasiticus* Speare, ambos do grupo *A. flavus* (11), ubíquitos na natureza e isolados de diversos alimentos e ração (1,3,7,16). Estas micotoxinas ocupam posição de destaque em ração animal, dada a sua capacidade em acumular em tecidos, assim como serem excretadas em seus produtos, leite e ovo (1,12,15).

Apesar da sua importância, são poucos os levantamentos realizados no Brasil (9). A maior parte dos

trabalhos nacionais foram desenvolvidos no Estado de São Paulo (4,10,12,13), não havendo a possibilidade de uma avaliação adequada da contaminação dos alimentos consumidos a nível nacional (9). No que se concerne à intoxicação, a escassez quase que total dos dados, faz ignorar o problema real existente, principalmente em animais, onde é comum a utilização de grãos de qualidade inferior, inclusive de refugos. Apesar da ocorrência provável de muitas intoxicações, estas tendem a não serem notadas, ou relatadas como doenças de etiologia desconhecida.

O presente trabalho relata um surto de intoxicação numa Cooperativa de Cunicultura na Região

- 1 - Depto. de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos - CCA. Universidade Estadual de Londrina.
Caixa Postal 6001 86051 - Londrina, PR. - Brasil.
2 - Secretaria de Indústria e Comércio.
86100 - Londrina, PR. - Brasil.
3 - Depto. de Agronomia - CCA - FUEL.
86051 - Londrina, PR. - Brasil.
4 - Depto. de Ciência de Alimentos - FEA - UNICAMP.
13081 - Campinas, SP. - Brasil.

Norte do Paraná, tendo como objetivo alertar sobre as consequências advindas da negligência e falta de controle na distribuição de alimentos animais. Com esta finalidade, os 7 estabelecimentos envolvidos no surto foram estudados e rações suspeitas analisadas quanto a micologia e presença de micotoxinas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras — O estudo microbiológico e a análise de micotoxinas foram realizadas em 6 amostras constituídas de ração granulada, milho e trigo coletados ao acaso nos estabelecimentos envolvidos em surto, no período de dezembro de 1986 a abril de 1987.

Micologia — As suspensões das amostras de ração foram plaqueadas em meio ágar coco (CAM) segundo LIN & DIANESE (5) adicionado de 0,5% de Triton X-100 (6) e tetraciclina ou estreptomicina. As placas foram incubadas a 25°C, analisando-se o desenvolvimento da cultura e da fluorescência no decorrer de uma semana. A identificação rápida do grupo *flavus* foi realizada em "Aspergillus differential medium" segundo BOTHA & FENNELL (2), analisando-se a seguir, produção de aflatoxinas em ágar coco. A identificação até a espécie do *Aspergillus* baseou-se em aspecto macroscópico das colônias e da morfologia microscópica das culturas isoladas segundo RAPER & FENNELL (11), em ágar batata dextrose.

Micotoxinas — A presença e quantificação de aflatoxinas, ocratoxina A, esterigmatocistina e zearalenona na ração foi realizada utilizando-se padrões de micotoxinas de Makor Chemical Ltda, Israel. A extração e quantificação foram realizadas segundo método de SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA (14). Para extração, 50,0 g de amostra foi homogeneizada com 30,0 ml de KCl a 4,0% e 270 ml de metanol, clarificada com sulfato de amônio e tratada com N-hexano. A amostra foi extraída com duas partições para 10,0 ml de clorofórmio e o resíduo obtido de 5,0 ml de cada fração, redissolvido em metanol. A cromatografia em camada delgada foi realizada com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico 5:4:1 e 6:4:0,05. A zearalenona e esterigmatocistina foram visualizadas pulverizando-se a placa com solução alcoólica de AlCl_3 a 20%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta o quadro geral dos surtos ocorridos na cunicultura da Região de Londrina en-

volvendo 955 animais adultos, resultando na perda de 560 (58,6%) coelhos. Com exceção do surto de intoxicação ocorrido no estabelecimento 1, todas foram causadas pela ração pertencendo ao mesmo lote de uma empresa fornecedora de alimentação animal. Assim sendo, o surto ocorrido no estabelecimento 1 e estabelecimentos 2 a 7 foram analisados separadamente.

No estabelecimento 1, os 150 animais afetados, sendo 25 matrizes, foram alimentados durante 20 dias com milho e trigo em dias alternados. Os coelhos mais afetados apresentavam sialorréia, deficiência respiratória e paralisia dos membros, observando-se à necrópsia, pulmão hemorrágico, rim congesto e fígado cirrótico com áreas de necrose. Bacilo Gram negativo com coloração bipolar, suspeito de *Pasteurella* sp foi isolado em cultura de material pulmonar. Uma contagem de 10^5 a 10^6 UFC/g de bolores, a maioria pertencentes a *A. flavus*, foi obtida nas amostras de trigo (Tabela 2). Aflatoxina B₁ num nível de 33 µg/Kg foi detectada em uma das amostras de trigo (Tabela 3). Sugere-se uma interação entre aflatoxicose e infecção nos animais afetados, oriunda da perda de resistência, resultante do efeito imunodepressorivo de aflatoxinas (7, 8, 16).

Nos estabelecimentos 2 a 7, análise de micotoxinas e a contagem de bolores foram realizados nos estabelecimentos 2, 3 e 4. Todavia, uma vez que todos os animais receberam ração granulada de mesma origem, a intoxicação foi interpretada em conjunto. Os animais envolvidos no surto apresen-

Tabela 1 — Estudos Epizootiológicos do Surto de Intoxicação em Cunicultura, Londrina - PR.

Estabelecimento	Data	Tipo de Alimentação	Número de Animais	
			Adultos ^a	Afetados Mortos
1	Dec/86	1A - milho 1B - Trigo não lavado 1C - Trigo lavado	25(150) ^b	4
	Fev/87	Ração granulada	200	6
	Apr/87	Ração granulada	400	380
2	Apr/87	Ração granulada	150	83(321)
3	Apr/87	Ração granulada	100	50(173)
4	Apr/87	Ração granulada	60	30
5	Apr/87	Ração granulada	20	7(22)
Total	—	—	955	560

a — Coelhos matrizes

b — () - Total de animais, incluindo coelhos adultos e respectivas crias

tavam anorexia e paralisia dos membros, seguida de morte. No estabelecimento 3, notou-se a perda de animais um dia após a ingestão da ração. O fornecimento do alimento prorrogou-se por mais três dias. No estabelecimento 4, os animais foram alimentados com a mesma ração no decorrer de 10 dias. A perda de animais teve início a partir do terceiro dia após fornecimento da alimentação. A necropsia de coelhos do estabelecimento 3 não apresentou alteração macroscópica dos órgãos freqüentemente acometidos em micotoxicose. O exame histopatológico demonstrou degeneração

hepática. Em um dos coelhos intoxicados, não foi detectada nenhuma alteração histológica, sugerindo que em intoxicação aguda de morte rápida, alterações histopatológicas podem ainda ser imperceptíveis (16).

Nenhum *A. flavus* foi isolado nas amostras de intoxicação envolvendo ração granulada (Tabela 2). Na amostra 2 foi detectada alta contagem de bolores, os quais foram identificados como *A. flaviceps*. Estes produziram componente fluorescente em ágar coco, entretanto este não deve ser o metabólito envolvido na intoxicação, já que *A. flaviceps* não foi detectado em ração granulada do estabelecimento 4 e não existe relato sobre sua toxicidade (3). As contagens relativamente baixas em amostras obtidas no estabelecimento 3 e 4 indicam que as rações receberam tratamento térmico capaz de eliminar os fungos, porém insuficiente para inativar as toxinas. Conseqüentemente, 110 e 44 µg/kg de aflatoxina B₁ foram detectadas nas amostras coletadas no estabelecimento 2 e 4, respectivamente. Por outro lado, componentes fluorescentes, provavelmente oriundos do metabolismo de outros fungos, assim como de complementação vegetal utilizada na ração, dificultaram a interpretação dos resultados (Tabela 3).

Uma correlação com lotes de milho importados em fevereiro de 1986 parece emergir. Embora aflatoxina não tenha sido detectada neste milho importado, a contaminação dos grãos, determinada pelo Blotter test atingiu 68% de *Aspergillus* sp. A amostra continha 1,2 x 10⁵ UFC/g de bolores, sendo que 3,0 x 10⁴ UFC/g pertenciam a *A. flavus*, segundo BOTHAST & FENNELL (2), potencialmente toxigênica.

Ainda com referência a este surto, o caso ocorrido no estabelecimento 2 foi comunicado, porém a não suspensão da distribuição de lote, conduziu a intoxicações em outras propriedades nos meses

Tabela 2 — Qualidade microbiológica da ração consumida pelos coelhos afetados.

Estabelecimento	Amostra	Contagem de Bolores (UFC ^a /g)	Fungos Isolados
1	1A - milho	3,2x10 ⁶	<i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Aspergillus</i> sp.
	1B - Triguilho não lavado	8,2x10 ⁶ (6,7x10 ⁶) ^b	<i>A. flavus</i> , <i>A. terreus</i> .
	1C - Triguilho lavado	2,3x10 ⁵ (1,0x10 ⁶)	<i>A. flavus</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp.
2	Ração granulada	2,8x10 ⁶	<i>A. flaviceps</i> , <i>A. clavatus</i>
3	Ração granulada	1,0x10 ⁴	<i>A. flaviceps</i> , <i>Penicillium</i> sp. <i>F. moniliforme</i>
4	Ração granulada	8,0x10 ³	<i>F. moniliforme</i>

a — UFC unidades formadoras de colônias.

b — Fungos com aspecto de *Aspergillus flavus*.

Tabela 3 — Detecção e quantificação das micotoxinas nas rações consumidas pelos coelhos afetados.

Amostra	Micotoxinas (µg/kg)						
	B ₁	Aflatoxinas			Esterigmatocistina	Ocratoxina	Zearalenona
	B ₂	G ₁	G ₂				
1A	ND ^a	ND	ND	ND	NA	ND	NA
1B	33	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1C	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	110	ND	ND	NA ^b	NA	ND	NA
3	ND	NA	NA	NA	NA	ND	NA
4	44	NA	ND	ND	NA	ND	ND

a — ND - Não detectado pelo método utilizado.

b — NA - Nada a afirmar - leitura impossibilitada devida a interferência de componentes presentes na ração.

subseqüentes, acarretando prejuízo e perigo de comercialização de animais contaminados para o consumo humano.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e CPG - Coordenadoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina, pelo apoio financeiro.

SUMMARY

Aflatoxicosis in rabbit farm in Londrina, Paraná, Brazil.

Aflatoxicosis in seven rabbit farms involving a loss of 560 (58,6%) matrix animals was reported in Londrina, North of Paraná, Brazil in the period of December 1986 to April 1987. With the exception of one establishment, all of them received pellet feed furnished by one feed producer. Mycological study and mycotoxin determination was undertaken in six suspected samples (1 corn, 2 wheat feeds and 3 granulated feeds) collected in the farms where the affected animals were located. The counting, isolation and identification of the fungal strains was determined using coconut agar, potato dextrose agar and "Aspergillus differential medium" from BOTHAST & FENNELL. *Aspergillus* sp was identified according to RAPER & FENNELL. The presence of aflatoxins, ochratoxin A, sterigmatocystin and zearalenone in the feed samples was determined using the method of SOARES & RODRIGUEZ-AMAYA. Aflatoxin B₁ was detected in three feed samples analysed, in a level of 33 µg/kg in wheat feed obtained from the establishment that was not using pellet feed; 110 and 44 µg/kg from pellet feed. Total mould count in these samples were $8,2 \times 10^6$, $2,8 \times 10^6$ and $8,0 \times 10^3$ CFU/g respectively. The predominant fungi in the sample was *A. flavus*, with a count of $6,7 \times 10^6$. In this establishment, the animals received corn and wheat in an alternate feeding program for 20 days; *Pasteurella* sp was detected in the pulmonary material from animals presenting respiratory abnormality, suggesting infection in consequence of immunodepressive effect of aflatoxicosis. In the pellet feed samples, *A. flaviceps* was the most abundant. The death of the animals began one to three days after ingestion of the contaminated feeds. *A. flavus* was not detected in the granulated feeds, suggesting that heat treatment during pro-

cessing eliminated them, but not their toxin.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aibara, K. - Aflatoxin: investigations on traditional foods and imported foodstuffs in Japan. In: Uraguchi, K. & Yamazaki, M. Ed., - Toxicology, biochemistry and pathology of mycotoxins. Tokyo, Kodansha, 1978.
2. Bothast, R. J. & Fennell, D.I. - A medium for rapid identification and enumeration of *Aspergillus flavus* and related organisms. *Mycologia*, 66: 365-369, 1974.
3. Cole, R. J. & Cox, R. H. - Handbook of toxic fungal metabolites. New York, Academic Press, 1981.
4. Fonseca, H. - Contribuição ao estudo da ocorrência de aflatoxina em tortas, farelos e farinha de amendoim, (*Arachis hypogaea* L.) no Estado de São Paulo. Tese de Doutorado. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, 1968.
5. Lin M. T. & Dianese, J. C. - A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* sp. *Phytopatology*, 66: 1466-1469, 1976.
6. Moreira, I. & Salzberg, S. P. C. - Modificação do meio de ágar coco adicionado de antibiótico (CAM-AB) para triagem de fungos toxigênicos em cereais. Encontro Nacional de Micotoxinas, II. Recife, 1985.
7. Pier, A. C. - Mycotoxins and animal health. *Adv. Vet. Med.*, 25: 185-243, 1981.
8. Pier, A. C.; Richard, J. L. & Thurston, J. R. The influence of mycotoxins on the resistance and immunity. In: National Academy of Sciences, - Interactions of mycotoxins in animal production. Washington, 1979.
9. Prado, G.; Mattos, S. V. M. & Pereira, E. C. - Níveis de aflatoxinas em alguns alimentos consumidos em Belo Horizonte no período de 1983 a 1989. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 9(2): 138-147, 1989.
10. Purchio, A. - Search of B₁ aflatoxin and similar fluorescent compounds in Brazilian cassava - flour. *Rev. Microbiol.*, 3: 121-125, 1972.
11. Raper, K. B. & Fennell, D. I. - The genus *Aspergillus*. Malabar, R.E. Krieger, 1977.
12. Sabino, M. - Variação de níveis de aflatoxina B₁ em alimentos e rações animais no período de 1971 a 1979. *Rev. Inst. A. Lutz*, 40(2): 153-158, 1980.
13. Scussel, V. M.; Rodriguez-Amaya, D. M. & Silva, W. I. - Incidência de aflatoxina em milho (*Zea mays* L.) e em seus produtos derivados, comercializados na região de Campinas, Estado de São Paulo, Brasil. *Cienc. Tecnol. Aliment.*, 6(1): 75-85, 1986.
14. Soares, L. M. V. & Rodrigues-Amaya, D. B. - Screening and quantitation of ochratoxin in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 68: 1128-1130, 1985.
15. Stoloff, L. - Mycotoxin residues in the edible animal tissues. In: National Academy of Sciences, - Interactions of mycotoxins in animal production. Washington, 1979.
16. Willie T. D. & Morchouse, L. G. - Mycotoxic fungi, mycotoxins, micotoxicoses - micotoxicoses of domestic and laboratory animals, poultry, and aquatic invertebrates and vertebrates. v.2. New York, Marcel Dekker, 1978.

Recebido para publicação em 23/02/90

LEUCOENCEFALOMALÁCIA EM EQÜINOS DO NORTE DO PARANÁ

Elisa Yoko Hirooka¹
Neusa M. A. Viotti²
Maria Angélica Marochi³
Kenji Ishii⁴
Yoshio Ueno⁴

RESUMO

Leucoencefalomalácia eqüina foi relatada em 14 estabelecimentos na região Norte do Paraná, no período de julho de 1985 a setembro de 1989. Todas as amostras de alimentos envolvidas continham milho em sua composição, sendo que a contagem total de bolores variou de 10^2 a 10^8 UFC/g de produto. As amostras não submetidas ao processamento térmico apresentaram elevada contaminação com *Fusarium moniliforme*, atingindo 10^5 a 10^8 UFC/g. Das toxinas pesquisadas, somente a zearalenona foi detectada em amostras de alimentos obtidas de 5 estabelecimentos. A interferência de componentes da ração impediu a análise de zearalenona em outras 5 amostras. A ausência de *F. moniliforme* em uma amostra e baixa contagem de bolores em rações granuladas envolvidas em intoxicação, indicam a eliminação dos fungos pelo tratamento térmico aplicado no seu preparo. Porém, sugere que a toxina de leucoencefalomalácia apresenta termo-resistência, o suficiente para suportar temperatura de processamento das rações.

INTRODUÇÃO

Leucoencefalomalácia, doença neurotóxica mais grave dos eqüídeos causada por *Fusarium* sp, é adquirida pela ingestão de milho (*Zea mays* L.) contaminado por toxinas produzidas por *F. moniliforme* (2,9,16,22). A intoxicação é caracterizada por lesões cerebrais, observando-se áreas de malácia na região subcortical do cérebro, em consequência ao estágio avançado da necrose liquefativa multifocal (2,15).

A doença ocorre esporadicamente em vários países de clima subtropical e temperado (9,11,14,20). Na América do Sul, os primeiros relatos têm sido descritos na Argentina por Rodriguez (17), sendo que no Brasil, maior freqüência de surto ocorre na Região Sul (1,7,16).

A fumonisina, toxina recentemente isolada de *F. moniliforme*, parece estar envolvida com a leucoencefalomalácia, já que Marasas & cols. (9) reproduziram a doença injetando diretamente a fumonisina B1 em eqüinos. Entretanto, isto não

1 Depto de Tecnologia de Alimentos e Medicamentos - CCA Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 6001 86051 - Londrina, PR - Brasil

2 Depto Med. Vet. Prev. Patol. Animal e Zootecnia - CCA Universidade Estadual de Londrina 86051 - Londrina, PR - Brasil

3 TECPAR - Curitiba, PR - Brasil

4 Dept. Toxicology and Microbial Chemistry Faculty of Pharmaceutical Sciences Science University of Tokyo, Tokyo 162 - Japão

elimina definitivamente a participação de outros metabólitos produzidos por *F. moniliforme*, tais como moniliformina, ácido fusárico e 2-metoxi-4-etil-fenol, também isolados de milhos envolvidos em leucoencefalomalácia (9,21).

F. moniliforme é um patógeno primário de milho (4); por outro lado, este é o componente fundamental no preparo de ração animal, dado ao seu custo e produção nacional. Entretanto, a contaminação por *F. moniliforme* em milho, inclusive selecionado para o plantio, atinge em torno de 70% em determinadas regiões do Paraná (comunicação pessoal, Instituto Agronômico do Paraná). Este fato torna crucial o papel desempenhado pelos metabólitos fúngicos em animais que o ingerirem, considerando que no Brasil é uma prática comum a utilização de grãos de baixa qualidade para o consumo animal.

Este trabalho relata surtos de leucoencefalomalácia ocorridos em eqüinos na região Norte do Paraná, no período de julho de 1985 a setembro de 1989, devido ao consumo de milho e seus subprodutos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras — O estudo microbiológico e a análise de micotoxinas foram realizadas em 16 amostras de milho e ração coletadas ao acaso nos estabelecimentos envolvidos com os surtos, no período de julho de 1985 a setembro de 1989. Os dados epidemiológicos foram observados em 14 estabelecimentos da região Norte do Paraná.

Micologia — As amostras de ração foram diluídas e plaqueadas em meio ágar coco (CAM) segundo Lin & Dianese (8) adicionado de 0,5% de Triton X-100 (12) e tetraciclina, cloranfenicol ou estreptomicina. As placas foram incubadas a 25°C, analisando-se periodicamente o desenvolvimento das colônias e da fluorescência no decorrer de uma semana. A identificação dos fungos baseou-se na morfologia das culturas isoladas em ágar batata dextrose, segundo técnicas micológicas usuais já descritas (13). A clonagem da linhagem foi realizada pela técnica de "single spore isolation" (13), semeando-se as colônias identificadas em ágar a 1,5%. Os esporos germinados foram retirados do ágar com o auxílio de uma agulha e estereoscópio da Nikon, SMZ - 18. A seguir, foram semeados em ágar batata dextrose para a estocagem a 4°C.

Micotoxinas — A presença e quantificação de aflatoxinas, ocratoxina A, esterigmatocistina e ze-

ralenona na ração foi realizada utilizando-se os padrões de micotoxinas da Makor Chemical, Israel. A extração e quantificação foram realizadas segundo método de Soares & Rodriguez-Amaya (19). Para extração foram utilizadas 50,0 g de amostra homogeneizada com 30,0 ml de KCl a 4,0% e 270,0 ml de metanol, clarificada com sulfato de amônio e tratada com N-hexano. A amostra foi extraída duas vezes com 10,0 ml de clorofórmio e o resíduo obtido de 5,0 ml de cada fração, redissolvido em metanol. A cromatografia em camada delgada foi realizada com tolueno-acetato de etila-ácido fórmico nas proporções de 5:4:1 e 6:4:0,05. A zearalenona e esterigmatocistina foram visualizadas pulvénizando-se a placa com solução alcoólica de AlCl₃ a 20%.

Estudo toxicológico das linhagens — As linhagens de *F. moniliforme* clonadas pela técnica de "single spore isolation" foram inoculadas num Erlenmeyer contendo 50,0 g de arroz esterilizado a 121°C/20 min e adicionada de 15,0 ml de água estéril. A seguir, incubou-se a 25°C durante 7 dias e por igual período a 8±1°C. A cultura em arroz foi desidratada a 60°C "overnight" e procedeu-se a extração, seguindo-se metodologia de Gelderblom & cols. (5) modificada, como segue. Uma quantidade de 20,0 g de material seco foi extraído com 100,0 ml de metanol-água 4:1 e filtrado em papel Whatman nº 1. O filtrado foi concentrado a 55°C num rotavapor (Likakai Co.), completando-se a secagem em vácuo. O extrato foi ressuspensão em 4,0 ml de água. A suspensão foi injetada intraperitonealmente em cahundongo linhagem DDYS de 9 semanas, macho. A primeira aplicação correspondeu a 1 g equivalente da cultura para 10 g de peso corpóreo (1 g eq/10 g PC), seguindo-se segunda aplicação após 6 horas, com 2 g eq/10g PC. O animal foi sacrificado e os órgãos analisados macroscopicamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os casos de leucoencefalomalácia eqüina descritos neste trabalho ocorreram no Norte do Paraná, que apresenta clima subtropical úmido (3), com a produção de milho desempenhando importância efetiva na economia regional (4). As condições climáticas locais são favoráveis ao desenvolvimento de *Fusarium* sp, sendo comum a fusariose em plantações de interesse econômico (4).

A Tabela 1 apresenta os dados epizootiológicos estudados nos 14 estabelecimentos envolvidos em leucoencefalomalácia. Os sinais clínicos predominantes em eqüinos afetados tem

sido os descritos na literatura (2). Observou-se anorexia, distúrbios nervosos com incoordenação motora, hiperexcitação, cegueira em alguns animais, culminando com a morte dentro de algumas horas a vários dias (2). Estes sinais clínicos típicos foram observados em nossos casos, exceto no estabelecimento 6, dada a rapidez da evolução da doença. Segundo Bridge (2) existem casos de intoxicação que, devido a fugacidade, inclusive não se observa alterações anatomo-patológicas. Todavia, em animais necropsiados, observou-se a região de encéfalo, abrangendo substância branca e cinzenta com necrose liquefativa de consistência gelatinosa, coloração amarelada com pontos hemorrágicos de tamanhos variáveis.

Tabela 1 — Estudos epizootiológicos de eqüinos acometidos por leucoencefalomalácia.

Estabele- cimento	Data	Tipo de alimentação	Animais mortos
1	jul/85	ração mista	7 (15)
2	set/85	resíduo de milho	2
3	set/85	resíduo de milho	1
4	mar/86	ração mista	1
5	jun/86	ração mista	1
6	jul/86	ração mista	1
7	mar/87	milho	6 (70)
8	set/87	8A-ração 8B-milho	1
9	out/87	9A-milho 9B-feno	1
10	dez/87	ração granulada	5
11	jul/88	milho	1
12	ago/89	milho	1
13	set/89	milho	1
14	set/89	ração granulada	1

() total de equinos envolvidos.

Os resultados apresentados na Tabela 2 indicam que as amostras envolvidas em leucoencefalomalácia apresentavam elevada contaminação fúngica, com predominância de *F. moniliforme*, exceto no 10, que consistia de ração granulada a qual apresentava baixa contagem de bolores e ausência de *F. moniliforme*. Entretanto, os 5 eqüinos mortos apresentaram sintomatologia característica e em um dos animais necropsiados, observou-se lesão cerebral com malácia. A ausência de *F. moniliforme* na amostra 10 demonstra que a ração sofreu processamento térmico, eliminando os fungos. Por outro lado, este fato reforça a termo-resistência destas toxinas, o suficiente para suportar tempera-

Tabela 2 — Contagem de fungos e bolores isolados de amostras de ração consumidas pelos eqüinos intoxicados.

Estabele- cimento	Contagem de Bolores UFC ^a /g	Fungos isolados
1	1,6x10 ⁷ (1,0x10 ⁷) ^b	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>A. grupo flavus</i> , <i>Rhizopus</i> sp
2	3,2x10 ⁶ (8,0x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>A. grupo flavus</i> , <i>Phoma</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp, <i>Mucoraceae</i>
3	2,8x10 ⁵ (1,8x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>A. grupo flavus</i> , <i>Mucoraceae</i>
4	6,5x10 ⁵ (1,0x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>A. grupo flavus</i>
5	6,7x10 ⁶ (6,0x10 ⁶)	<i>F. moniliforme</i> , <i>A. grupo flavus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> sp
6	9,0x10 ⁵ (3,0x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>A. grupo flavus</i> , <i>Penicillium</i> sp
7	4,9x10 ⁶ (5,0x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>A. grupo flavus</i> , <i>A. terreus</i>
8	A-1,0x10 ² B-2,3x10 ⁶ (1,4x10 ⁶)	<i>Mucoraceae</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp <i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp
9	A-1,0x10 ⁴ B-1,6x10 ⁶ (2,0x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>Fusarium</i> sp, <i>Penicillium</i> sp
10	1,5x10 ²	<i>Aspergillus</i> sp, <i>Neurospora</i> sp
11	3,4x10 ⁶ (5,0x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>A. grupo flavus</i>
12	1,8x10 ⁶ (7,0x10 ⁵)	<i>F. moniliforme</i> , <i>A. grupo flavus</i>
13	1,0x10 ⁸ (1,0x10 ⁸)	<i>F. moniliforme</i>
14	9,0x10 ³	<i>F. moniliforme</i> , <i>Penicillium</i> sp, <i>A. grupo flavus</i> , <i>Rhizopus</i> sp

a - Unidade formadora de colônia.

b - Contagem de colônias com aspecto de *Fusarium* sp.

tura utilizada no preparo das rações. No estabelecimento 8, os animais receberam, simultaneamente, ração e milho, sendo que apenas o segundo apresentou elevada contaminação com *Fusarium* sp. Entretanto, isto não descarta o envolvimento da ração na intoxicação.

Elevada contagem de *F. moniliforme* ocorreu na maioria dos alimentos envolvidos, já que esta é a única espécie deste gênero capaz de multiplicar em condição de estocagem (1,23). Outros *Fusarium* sp fitopatogênicos tendem a desaparecer durante a estocagem, permanecendo apenas as respectivas toxinas, produzidas no período de pré-colheita (23). Entretanto, até o presente momento, desconhece-se a capacidade de *F. moniliforme* em produzir metabólitos responsáveis pela leucoencefalomalácia, em condição de estocagem, presumindo-se que a mesma seja relativamente estável, levando em consideração o tempo de estocagem dos grãos envolvidos em intoxicações, assim como o processamento térmico das rações.

Os fungos do gênero *Fusarium* sp tem sua

temperatura ótima de crescimento entre 20-25° C, necessita de atividade de água (aw) em torno de 0,9, entretanto, a produção de toxina ocorre em temperatura baixa (10,14,15,20).

A zearalenona foi detectada em 5 amostras de alimentos envolvidos (milho, resíduo de milho, ração mista e ração granulada) como se observa na Tabela 3. Estes resultados estão de acordo com os achados de Sabino & cols. (18), que relataram a ocorrência natural de zearalenona em 4,8% dos milhos analisados no Brasil.

Embora zearalenona não seja responsável pela leucoencefalomalácia, não é rara a ocorrência simultânea de várias fusariotoxinas (6,11,22). Consequentemente, pode-se inferir que houve condições para produção de outros metabólitos, que poderiam, eventualmente, ter causado a morte dos animais.

Em várias amostras observou-se contaminação simultânea de *Aspergillus* do grupo *flavus* (tabela 2), porém aflatoxinas não foram detectadas em nenhuma amostra pelo método utilizado. Entretanto, em 4 amostras, a interpretação foi impossibilitada devido a presença de componentes interferentes da ração.

A presença de tricotecenos (toxina T-2, diace-

toxiscirpenol, roridina A e verrucarina) foram pesquisadas nas amostras 8A, 8B, 9A, 9B e 10, porém, não foram detectados (dados não apresentados).

Na análise toxicológica das linhagens de *F. moniliforme*, procedeu-se a extração com água e metanol, visto que a fumonisina apresenta na sua estrutura vários radicais polares (5), tornando-a hidrossolúvel. Nenhum camundongo inoculado apresentou quadro de intoxicação aguda, nem lesões macroscópicamente significativas nos órgãos vitais. A negatividade dos resultados talvez possa ser atribuída a diferença no animal "alvo". Porém, deve-se considerar que a experiência teve como finalidade detectar apenas aspectos agudos da intoxicação. Gelderblom & cols. (5) observaram atividade promotora de câncer pela fumonisina, introduzindo esta toxina em ração.

Apesar de não causar intoxicação aguda, como ocorre em equídeos, não se pode descartar efeito cancerígeno da fumonisina em alimentos, dada a freqüência de contaminação do milho por *F. moniliforme* e utilização deste produto na alimentação humana.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq — Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CPG — Coordenadoria de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina e Science University of Tokyo, pelo apoio financeiro. Dra Lúcia M. V. Soares da FEA — UNICAMP, pela discussão.

SUMMARY

Leukoencephalomalacia in equines in the North of Paraná, Brazil.

A total of 14 episodes of leukoencephalomalacia was related in North of Paraná, during the period of July 1985 to September 1989. All of the feeds, obtained from the farms involved in the intoxication cases, had corn as main ingredient. Mycological study and mycotoxin determination were undertaken in 16 samples of 5 mixed feeds, 8 maizes, 2 granulated feeds and 1 hay. The counting, isolation and identification of the fungal strains were determined using coconut agar added with 0,5% triton X-100 plus antibiotics and potato dextrose agar. The 13 *Fusarium moniliforme* strains isolated from the feeds involved in the intoxication cases were submitted to single spore isolation and

Tabela 3 — Análise de micotoxinas em amostras de ração consumidas pelos eqüinos intoxicados.

Estabele- cimento	Nicotoxinas (mg/kg)			
	I	II	III	IV
1	(-) ^a	(-)	(-)	19,0
2	(-)	(-)	(-)	0,7
3	(-)	(-)	(-)	NA ^b
4	(-)	(-)	(-)	(-)
5	NA	NA	NA	NA
6	(-)	(-)	(-)	(-)
7	NA	NA	NA	NA
8A	NA	NA	NA	NA
8B	(-)	(-)	(-)	(-)
9A	(-)	(-)	(-)	(-)
9B	(-)	(-)	(-)	(-)
10	(-)	(-)	(-)	(-)
11	(-)	NA	(-)	NA
12	NA	(-)	(-)	>3,2
13	(-)	(-)	(-)	(+) ^c
14	(-)	NA	(-)	(+)

I - Aflatoxinas B¹, B², G¹ e G²

II - Esterigmatocistina

III - Ocratoxina

IV - Zearalenona

a - não detectada pela metodologia utilizada

b - nada a afirmar, leitura impossibilitada

c - positiva, sem quantificação

analysed for acute toxicity, injecting the concentrate obtained from rice culture extract, intraperitoneally in the mouse. The presence of aflatoxins, ochratoxin A, sterigmatocystin and zearalenone in the feed samples was determined by the method of Soares & Rodrigues-Amaya. The total mould count ranged from 10^2 to 10^8 CFU/g of product. It consisted mainly of *F. moniliforme*, *Penicillium* sp and *Aspergillus flavus* group, isolating also *Mucoraceae*, *Aspergillus terreus* and *Neurospora* sp. The feed samples without thermal processing had high *F. moniliforme* contamination, with *Fusarium* like colony count, varying from 10^5 to 10^8 CFU/g in 11 samples. Zearalenone was detected in samples taken from 5 establishments. Feed components impeded the zearalenone analysis in other 5 samples. Tests for the presence of T-2 toxin, diacetoxyscirpenol, roridin A and verrucarin in 5 feed samples gave negative results. None of the mouse inoculated with *F. moniliforme* culture extract presented neither acute intoxication symptoms, nor macroscopically significant lesions. In the pellet feeds involved in the intoxication, the absence of *F. moniliforme* in a sample and low fungal contamination in another, suggested their elimination during feed production. On the other hand, it showed that leukoencephalomalacia's toxin is resistant enough to support heat treatment used for feed processing.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barros, C. S. L.; Barros, S. L.; Santos, M. N. & Souza, M. A. — Leucoencefalomalácia em eqüinos no Rio Grande do Sul. *Pesq. Vet. Bras.*, 4:101-7, 1984.
- Bridge, C. H. — Mycotoxicoses in horses. In: Willie T. D. & Morehouse, L. G. — Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. v. 2. New York, Marcel Dekker, 1978.
- Estado do Paraná / Secretaria de Agricultura. Características climáticas de Londrina (2 ed.). Circ. IAPAR, n 5 16p, 1982.
- Estado do Paraná / Secretaria da Agricultura. — O milho do Paraná. Circ. IAPAR, n 29, 117p, 1982.
- Gelderblom, W. C. A.; Jaskiewicz, K.; Marasas, W. F. O.; Thiel, P. G.; Horak, R. M.; Vleggaar, R. & Kriek, N. P. J. — Fumonisins — novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *F. moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:1806-11, 1988.
- Hagler, W. M.; Tyczkowska, K. & Hamilton, P. B. — Simultaneous occurrence of deoxynivalenol, zearalenone, and aflatoxin in 1982 scabby wheat from the Midwestern United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, 47:151-54, 1984.
- Hirooka, E. Y.; Viotti, N. M. A.; Soares, L. M. V. & Alfieri, A. A. — Intoxicação em eqüinos por mico-
- toxinas produzidas por *F. moniliforme* no Norte do Paraná. *Semina*, 9:135-41, 1988.
- Lin, M. T. & Dianese, J. C. — A coconut-agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology*, 66:1466-69, 1976.
- Marasas, W. F. O.; Kellerman, T. S.; Gelderblom, W. C. A.; Wetzer, J. A. W.; Thiel, P. G. & Vanderlugt, J. J. Leukoencephalomalacia in a horse induced by fumonisin B1 isolated from *F. moniliforme*. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 55: 197-203, 1988.
- Mirocha, C. J.; Pathre, S. V. & Christensen, C. M. — Chemistry of *Fusarium* and *Stachybotrys* mycotoxins. In: Wyllie, T. D. & Morehouse, L. G. ed., — Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. v.1. New York, Marcel Dekker, 1977.
- Mirocha, C. J.; Schauerhamer, B.; Christensen, C. M.; Niku-Paavola, M. L. & Nummi, N. — Incidence of zearalenol (*Fusarium* mycotoxin) in animal feed. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38:749-50, 1979.
- Moreira, I. & Salzberg, S. P. C. — Modificação do meio de ágar coco adicionado de antibiótico (CAM-AB) para a triagem de fungos toxigênicos em cereais. Encontro Nacional de Micotoxina, II, Recife, 1985.
- Nelson, P. E.; Tousson, T. A. & Marasas, W. F. O. — *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, 1983.
- Orth, R. — Einfluss physikalischer faktoren auf die bildung von mykotoxinen. In: Reiss, J. — Mycotoxine in Lebensmittein. Stuttgart & New York, Gustav Fisher, 1981.
- Pier, A. C. — Mycotoxin and animal health. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 25:185-243, 1981.
- Riet-Correa, F.; Meirelles, M. A.; Soares, J. M.; Machado, J. J. & Zambrano, A. F. — Leucoencefalomalácia em eqüinos associada à ingestão de milho mofado. *Pesq. Vet. Bras.*; 2:27-30, 1982.
- Rodriguez, J. A. — Diferenciación entre la enfermedad de los rastros y la meningoencefalomielitis infecciosa de los eqüinos. *Anales Soc. Argentina*, 69:305-7, 1945.
- Sabino, M.; Prado, G.; Inomata, E. I.; Pedroso, M. O. & Garcia, R. V. — Natural occurrence of aflatoxins and zearalenone in maize in Brazil. Part II. *Food Add. Contam.*, 6:327-31, 1989.
- Soares, L. M. V. & Rodriguez-Amaya, D. B. — Screening and quantitation of ochratoxin in corn, peanuts, beans, rice and cassava. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*; 68:1128-30, 1985.
- Sutton, J. C.; Baliko, W. & Funnell, H. S. Relation of weather variables to incidence of zearalenone in corn in southern Ontario. *Can. J. Plant Sci.*; 60:149-55, 1980.
- Thiel, P. G.; Gelderblom, W. C. A.; Marasas, W. F. O.; Nelson, P. E.; Wilson, T. M. — Natural occurrence of moniliformin and fusarin C in corn screenings known to be hepatocarcinogenic in rats. *J. Agri. Food Chemist.*, 34:773-5, 1986.
- Ueno, Y. — Trichothecenes — chemical, biological and toxicological aspects. Tokyo, Kodansha, 1983.
- Willie, T. D. & Morehouse, L. G. — Mycotoxic fungi, mycotoxins, mycotoxicoses. v.1. New York, Marcel Dekker, 1977.

Recebido para publicação em 14/3/90

DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL 50% PARA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (NCTC 8530) EM CAMUNDONGOS PORTADORES DE TUMOR DE EHRLICH.

Antonio Olavo Cardoso Jorge¹

Sonia Vieira²

José Francisco Hofling³

Oslei Paes de Almeida³

RESUMO

Camundongos normais e portadores de tumor de Ehrlich foram infectados com *Staphylococcus aureus* (NCTC 8530), e a Dose Letal 50 (DL50) determinada usando-se a análise de probitos. Os resultados demonstraram que para os tempos de 24 a 48 horas, a DL50 foi maior para camundongos portadores do tumor, embora sem significância estatística.

Palavras chaves: *Staphylococcus aureus*, DL50, tumor de Ehrlich

INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas estão associadas, primária e secundariamente, a alterações do sistema de defesa do organismo (3, 5, 10, 11, 17). Pacientes com câncer podem apresentar deficiências de imunidade celular, como diminuição na proliferação de linfócitos "in vitro" e menor resposta a testes cutâneos de hipersensibilidade retardada (14). Em neoplasias transplantáveis, como o tumor de Ehrlich, a interação das células tumorais com os mecanismos de defesa do hospedeiro são controvértidos. Segundo SPITALNY (1980), SPITALNY E NORTH (1977) e SNYDERMAN e cols. (1976), há diminuição da atividade dos macrófagos, enquanto GUERRA (1983) observou que os macrófagos estão com seu potencial fagocitário aumentado. Por outro lado, BAIOCHI e cols. (1986), não observaram alterações na atividade imunológica de animais portadores de tumor de Ehrlich.

Estimulando ou deprimindo a resposta de defesa, as neoplasias podem modificar a suscetibilidade do hospedeiro às infecções. Em vista destes fatos, somados a importância de que se reveste o gênero *Staphylococcus*, tanto para a patologia humana como animal, o objetivo do presente trabalho foi verificar, através da determinação da DL50, o comportamento de camundongos portadores de tumor de Ehrlich à infecção produzida por *S.aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 160 camundongos Swiss, fêmeas, pesando de 20 a 25 g. Inicialmente os animais foram separados em 10 grupos, cada um com 16 camundongos. Os animais de cada grupo foram numerados, pesados e sorteados, formando dois subgrupos de 8 animais; controle e portadores de tumor de Ehrlich. Para obtenção de camundongos

1. Departamento de Patologia — Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos/UNESP.
Caixa Postal 314 — São José dos Campos, SP. — CEP 12245
2. Departamento de Odontologia Social — Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.
3. Departamento de Diagnóstico Oral — Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP

portadores de tumor de Ehrlich, foram injetados 0,1 ml de líquido peritoneal, coletado de um animal portador do tumor na forma ascítica, no coxim plantar da pata posterior direita do animal. Após 7 dias, quando havia acentuado crescimento do tumor de Ehrlich na pata, os camundongos foram usados para determinação da DL50.

A amostra padrão de *S. aureus* (NCTC 8530) foi inoculada em frasco de Erlenmeyer, contendo 100 ml de meio Brain Heart Infusion Broth (Difco), e incubados a 37°C durante 18 horas. Alíquotas de 20 ml da cultura obtida, foram centrifugadas a 5000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C., sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendo em 20 ml de solução esterilizada de NaCl a 0,9%. O mesmo procedimento foi repetido por mais duas vezes, para obtenção da suspensão final. Para o cálculo da quantidade de microrganismos na suspensão final, foi feito um gráfico de padronização, correlacionando densidade óptica (D.O.) de suspensões de *S. aureus*, medidas em espectrofotômetro a 490 nm, com unidades formadoras de colônias por ml (u.f.c./ml). A reta de regressão obtida ($Y = 0,005 + 0,10473 X$), está representada na figura 1.

Para a obtenção da DL50, os animais foram injetados endovenosamente através da veia lateral da cauda, com 0,5 ml de concentrações crescentes de *S. aureus*. Os camundongos foram observados durante 7 dias, e anotados os que morreram neste período. A análise estatística foi feita através de probitos, usando o método de estimadores de máxima verossimilhança (9).

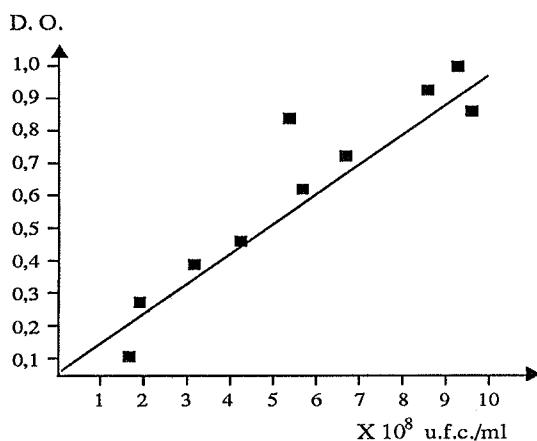


Figura 1 — Gráfico de padronização do número de microrganismos, representando a reta de regressão obtida através de contagens de unidades formadoras de colônias por mililitro (u.f.c./ml) nas diversas densidades ópticas (D.O.) semeadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste de patogenicidade "in vivo" em camundongos para *S. aureus*, foi feito de acordo com as descrições de DAMETTO e ZELANTE (1983), que demonstraram a eficiência do método, empregando a via endovenosa e contagem do número de bactérias inoculadas através de leitura em espectrofotômetro e padronização em u.f.c./ml. Realmente, os valores das DL50 obtidas neste trabalho (Tabela 1), estão de acordo com os estudos de GORRIL E Mc NEIL (1963) e FURUSAWA E MIYOSHI (1975), que relataram letalidade para camundongos com doses de 10^8 u.f.c./ml por via endovenosa. O ajuste de probitos permitiu que fossem traçadas as curvas de proporção estimada de mortalidade dos animais com tumor de Ehrlich e normais, em função do logaritmo da dose inoculada (Figura 2). A evolução do tumor de Ehrlich na pata dos camundongos também correspondeu aos resultados descritos por GUERRA (1983), que estudou extensivamente o desenvolvimento deste tumor. Utilizando-se destes parâmetros bem determinados, os resultados deste trabalho indicaram, que camundongos portadores do tumor de Ehrlich não apresentaram alteração na susceptibilidade à infecção por *S. aureus*, pois embora a DL50 tenha sido maior para os camundongos portadores de tumor de Ehrlich nos períodos de 24 e 48 horas, os resultados não foram estatisticamente significativos ao nível de 5%.

Aparentemente os resultados deste trabalho, não estão de acordo com dados da literatura, mostrando que a presença de células neoplásicas podem alterar os mecanismos de defesa do hospedeiro (7, 12, 16). Entretanto, alguns fatores devem ser levados em consideração. A maioria dos estudos, descrevem a atividade de fatores neoplásicos nas células inflamatórias, no local de desenvolvimento de

Tabela 1 — DL50 obtidas após 1,2 e 7 dias da inoculação de *S. aureus* em camundongos portadores de tumor de Ehrlich e em camundongos normais. Os valores estão apresentados em densidade óptica (D.O.) e unidades formadoras de colônias por mililitro (u.f.c./ml).

Dias após Inoculação	Tumor de Ehrlich		Normais	
	D.O.	u.f.c./ml	D.O.	u.f.c./ml
1	1,1180	$11,7 \times 10^8$	0,6319	$6,2 \times 10^8$
2	0,5643	$5,9 \times 10^8$	0,4069	$4,2 \times 10^8$
7	0,2414	$2,5 \times 10^8$	0,2667	$2,7 \times 10^8$

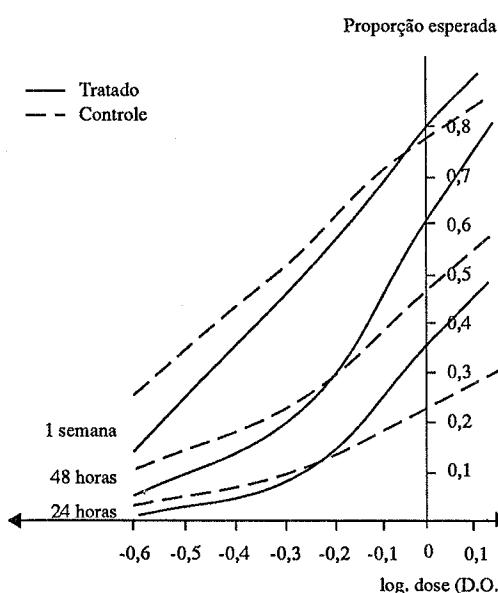


Figura 2 — Curvas ajustadas das proporções estimadas de camundongos mortos em função do logaritmo da dose inoculada (análise de probitos).

doença (7, 16), ou em nódulos linfáticos regionais (12), enquanto que no modelo usado neste trabalho procurou-se determinar um possível efeito sistêmico. As bactérias injetadas endovenosamente são destruídas principalmente pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocítário, e portanto, a neoplasia teria que atuar em órgãos como fígado, baço e linfonodos. O tumor de Ehrlich não provoca metástases, embora localmente seja bastante invasivo (18), crescendo em camundongos como um parasita não rejeitado pelo hospedeiro (7), não alterando a resposta inflamatória ou imunológica. BAIOCHI e cols. (1986) verificaram que animais com tumor de Ehrlich não apresentaram diferenças na atividade imunológica em relação ao grupo de camundongos normais. BERZYNGIER e cols. (1985), observaram que animais portadores de tumor de Ehrlich na forma sólida, não apresentaram alterações hemostásicas em relação a camundongos normais.

O modelo usado permitiu analisar os resultados em relação à infecção sistêmica aguda, e é possível que animais com tumor por período mais longo, ao invés de uma semana, apresentem modificações da resistência, que podem ser devidas a um processo análogo de desnutrição, sem haver necessariamente, interação específica entre a neoplasia e os mecanismos de defesa.

Para melhor entendimento da influência das

neoplasias na resistência do hospedeiro às infecções e dos mecanismos envolvidos, outros estudos similares são necessários usando-se outras neoplasias transplantáveis, como o carcinoma de Walker que provoca metástase (13), e neoplasias provocadas por substâncias químicas como o dimetilbenzantreno.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Vera Fantinatto Dametto (Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos/UNESP), que gentilmente nos cedeu a amostra do microrganismo e ao Sr. Pedro Duarte Novaes, Técnico Especializado de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

SUMMARY

Lethal dose 50% (LD50) TO *Staphylococcus aureus* (NCTC 8530) in mice bearing Ehrlich's tumor.

Some forms of cancer are associated with alterations of the immune system, as decreased proliferation of lymphocytes and smaller responses to skin hypersensitivity tests. These alterations can modify the susceptibility of the host to infections. The aim of this work was to determine the lethal dose 50% (LD 50) to *Staphylococcus aureus* (NCTC 8530) for normal and mice bearing Ehrlich's tumor. 0.1 ml of Ehrlich's tumor cells from the peritoneal cavity of mice bearing the tumor in the ascitic form was injected subcutaneously into the right posterior foot pad of Swiss mice. After 7 days there was an evident growth of the tumor and the animals were used with matched controls to determine the LD50, according to Dametto and Zeilante (1983). The animals were injected into the lateral vein of the tail with different concentrations of *S. aureus*, determined spectrophotometrically and the number of death recorded during 7 days. The statistical analyses was made by the method of probits. The results showed that for the periods of 24 and 48 hours the LD50 was higher for mice bearing tumor, nevertheless the difference was not statistically significant.

The LD50 obtained in this work was similar to the studies of Gorril and McNeil (1963) and Furusawa and Miyoshi (1975) who described intravenous doses of 108 UFC/ml of *S. aureus* for mice. The development of the tumor also was according with the results of Guerra (1983). Although some

works show that tumor cells can modify the defense mechanisms, some points must be considered. These studies describe the modifications of the inflammatory cells when in direct contact the tumor, or in regional limphonodes. In this work the bacteria were injected intravenously and therefore the alterations had to be systemic, affecting macrophages of the liver and spleen. Ehrlich's tumor do not provoke metastasis, and although locally invasive, seems to grow in mice as a parasite without altering the general inflammatory responses. This observation is in agreement with Baiochi et al. (1986) and Berzyngier et al. (1985) who observed no hemostatic or immunological alteration in mice bearing Ehrlich's tumor. It is possible however, that in advanced stages of the tumor the resistance of the animals is decreased, but this probably would be associated with desnutrition rather than an interaction between the neoplastic cells and the defense mechanisms.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baiochi, E.; Bigonha, J. G.; Heymann, R. E.; Feder, D.; Cabral, M.; Zyngier, S. B. - Estrógeno em tumor de Ehrlich: estudo da sobrevida e avaliação da resposta imunológica. *Arg. med. ABC*, 9:22-27, 1986.
2. Berzyngier, S.; Barreto, O. C.; Coelho, E.; Eichbaum, F. W. - Alterações da hemostasia em alguns tumores experimentais. *Rev. paul. med.* 103:72-74, 1985.
3. Byers, V. S.; Baldwin, R. W. - Imunologia dos tumores. In: - Fundenberg, H. H.; Stites, D. P.; Caldwell, J. L.; Wells, J.V. *Imunologia básica e clínica*. 2.ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, cap. 24, p. 292, 1980.
4. Dametto, V. F.; Zelante, F. - Capacidade letal de raças de *Staphylococcus* coagulase negativas e desoxirribonuclease positivas, para camundongos. *Rev. Odont. UNESP*, 12:83-87, 1983.
5. Eccles, S. A.; Alexander, P. - Macrophages content of tumour in relation to metastatic spread and host immune reation. *Nature*, 250:667-669, 1974.
6. Furusawa, K.; Miyoshi Y. - Virulence of genus *Staphylococcus*. III. Studies on pathogenicity to mice. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, 22:1-8, 1975.
7. Guerra, J. L. - Aspectos do processo inflamatório em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. São Paulo 1983, 79p. (Tese de doutorado — Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia — Universidade de São Paulo).
8. Gorril, R. H.; McNEIL, E. M. - Staphylococcal infection in the mouse. I. The effect of route of injection. *Brit. J. Exp. Pathol.*, 44:404-415, 1963.
9. Hoffmann, R.; Vieira, S. - Análise de regressão. 2.ed. São Paulo, Hucitec, 1987.
10. Kalil, J. - Imunologia dos tumores. In: - Calich, V. L. G.; Vaz, C. A. C. Imunologia básica. Artes Médicas, Rio de Janeiro, cap. 16, p.309, 1988.
11. Lamon, E.W. - Immunologic dysfunction: transplantation, immunosuppression, tumor immunology, and autoimmunity. In: Mac Ghete, J. R.; Michaler, S. M.; Cassel, G. H. *Dental microbiology*. Harper Row, Philadelphia, cap.13, p.298, 1982.
12. Mattos, M. C. F. I.; Franco, M. F.; Basso, N. A. - Histopatologia dos nódulos linfáticos regionais e distantes de ratos transplantados com tumor de Walker. *Ci.e Cult.*, 26:175-179, 1974.
13. Mattos, M. C. F. I.; Montenegro M. R.; Silva, C. R. V. - Walker 256 carcinossarcoma: pathology, microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells. *Ci.e Cult.*, 32:849-857, 1980.
14. Scully, C. - The immunology of cancer of the head and neck with particular reference to oral cancer. *Oral Surg.*, 53:157-169, 1982.
15. Snyderman, R.; Pike, M. C.; Blaylock, B. L.; Weinstein, P. - Effects of neoplasms in inflammation: depression of macrophage accumulation after tumor implantation. *J. Immunol.*, 166:585-589, 1976.
16. Spitalny, G. L.; North, J.R. - Subversion of host defense mechanisms by malignant tumours: an established tumor as a privileged site for bacterial growth. *J. exp. Med.* 145:1264-1277, 1977.
17. Spitalny, G.L. - Supression of bacterial activity of macrophages in ascites tumors. *Res. J. Reticuloendothel. Soc.*, 28:223-235, 1980.
18. Sugiura, K. - Tumor transplantation. In: - Gay I. W. *Methods of animal experimentation*. Academic Press, New York, p. 178, 1965.

Recebido para publicação em 12/2/90

CYTOLOGICAL OBSERVATIONS IN CONIDIAL AND MYCELIAL CELLS OF *HUMICOLA* SP

E.C. Rodrigues¹
Y. Tanaka²
A.A. Pizzirani-Kleiner²

SUMMARY

The object of the present study was to describe aspects of nuclear behavior during mitotic division in conidial and mycelial cells of the cellulolytic fungus *Humicola* sp. The sequence of mitotic events was similar to that observed in other filamentous fungi. The number of chromosomes observed at the end of metaphase could not be determined with certainty but appeared to be between 6 and 8. *Humicola* sp cultures frequently showed hyphal anastomosis and the presence of nuclei in the hyphal bridge, this would permit the occurrence of heterokaryosis, and it indicates that the parasexual cycle may occur in this species.

INTRODUCTION

The genus *Humicola* is characterized by the production of simple or not extensively branched conidiophores with globose or subglobose, unicellular apical conidia, denoted aleuriospores. Some species also produce simple phialids and chain phialospores (5).

Few studies have been published on the cytology and genetics of this genus, although there are taxonomic studies (8, 10, 12, 15). In an investigation of the causes of variability in this genus De Bertoldi (7) studied the distribution of nuclei in several strains of the genus. He observed that the aleuriospores of all, except one of the strains studied, were always polynucleate, with a strict relationship between number of nuclei and aleuriospore size. He noted also that the mycelial cells of these strains are mainly polynucleate, with anastomosis between hyphae being common. It was

then suggested that heterokaryosis might be responsible for the observed variability, in that a mutation in one nucleus could be sufficient to give rise to a heterokaryon. De Bertoldi & Caten (9) described the occurrence of the parasexual cycle in a *Humicola* species, and showed that the 6 markers studied were located on at least 4 different linkage groups.

In view of the lack of detailed reports on nuclear behavior during mitosis, and because of the importance of chromosome variation in *Humicola*, the present study was designed to clarify these issues by cytological observation.

MATERIAL AND METHODS

Conidia and mycelial cells of the wild strain of *Humicola* sp, a cellulolytic fungus isolated by Chaves (6), were cultured in complete medium

1. Departamento de Bioquímica e Microbiologia - Instituto de Biociências - Campus de Rio Claro -UNESP Caixa Postal, 178 - 13500 Rio Claro, SP , Brasil
2. Departamento de Genética - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" -Universidade de São Paulo - Caixa Postal, 83 - 13400 Piracicaba - SP, Brasil

(14) at 40-42°C for 3, 4 or 7 days. Nuclei were stained by the technique of Tanaka et al. (17).

Mycelial spores and hyphae were allowed to adhere to coverslips coated with 50% (v/v) albumin in glycerine, and fixed by immersion in 3:1 ethyl alcohol: acetic acid for 30 minutes at room temperature. Hydration was by successively treatments with 95% and 70% alcohol, and hydrolysis was performed using 1 N hydrochloric acid for 10 to 12 minutes at 60°C. Specimens were stained by immersion in Giemsa solution diluted 5 times with 0.07 M sodium phosphate buffer, pH 7.0, for 20 to 30 minutes. Excess stain was removed by washing with the same buffer. Observations were made with an Olympus microscope, Model BHS, coupled to an Olympus photomicrographic system, Model PM-10 AD when necessary.

RESULTS

The strain showed multinucleate conidial and mycelial cells. The nuclei varied in size and shape both in conidia and in somatic mycelial cells, depending on the stage of cell division. In both cases, division was classified into five stages, according to nuclear size and shape, using the criterion proposed by Tanaka (16) for the filamentous fungus *Pyricularia oryzae*.

Division was similar in mycelia and conidia, except that in young conidia the process usually occurred synchronously.

Interphase — Interphase nuclei were spherical to subspherical and compacted both in mature conidia (cultures incubated for 7 days) and in mycelial cells (Figures 1.a and 2.e). Spherical and concentrated nucleoli were frequently encountered in association with the nuclei.

Prophase — The nuclei of young conidia (cultures incubated for 3 to 4 days) were irregular and oval or elongated (Figure 1.a). At advanced prophase stages, the nucleolus disappeared. At prometaphase, chromatin bodies in the form of a thread, line or ring were observed (Figures 1.b and 1.c). In somatic cells, spherical prophase nuclei measured 2 to 3 µm in diameter, and elongated nuclei were more than 5 µm in diameter (Figures 2.e and 2.f).

Metaphase — Nuclei showing chromosomes, irregular chromatin bodies not differentiated into chromosomes or shaped as rosary beads were in-

cluded in the metaphase of the fungus (Figures 1.c and 1.d, 2.f and 2.g). Though the very small nuclei did not permit chromosome identification 7 to 8 particles were occasionally observed in conidial cells at metaphase (Figure 1.e). Chromosome-like bodies were very seldom observed in mycelial cells; on the rare occasions on which they were detected, 5 to 6 particles could be counted.

Anaphase-Telophase — Two very close nuclei connected by chromatin threads were classified as anaphase (Figures 1.f and 2.g). In mycelial cells, the nuclei usually move in the direction opposite to the elongation of the hypha. Two daughter nuclei, more separated but still joined by chromatin threads or groups, were often observed and were assumed to correspond to the telophase stage (Figures 1.g, 1.h and 2.h). Separated daughter nuclei, rarely distinguishable from interphase nuclei were observed during more advanced telophase stages.

Hyphal anastomosis — The ramifications of *Humicola* sp hyphae were usually at right angles, with the main axis. Hyphal anastomosis was observed frequently. Figures 2.b and 2.c show different stages of the process of hyphal anastomosis. Fusion can occur in any part of the colony both between parallel hyphal with an H-type connection (Figure 2.d) and between a hyphal end and the lateral wall of another hypha. The presence of nuclei in the hyphal bridge was also often observed.

DISCUSSION

The present observations of nuclear division in conidial and mycelial cells of *Humicola* sp showed mitosis to be similar to that other filamentous fungi such as *Endogone sphagnophila* Atk (4), *Fusarium oxysporum* (2), *Ceratocystis fagacearum* (1,3) *Macrophomina phaseoli* (11) and *Pyricularia oryzae* (16).

Nuclear division started in *Humicola* sp conidia with spherical or slightly ovoidal nuclei, which supposedly are interphase nuclei, underwent elongation, representing the initial stage of prophase. No nucleolus was observed during more advanced prophase stages, as is the case for other organisms. At prometaphase, the nucleus had the appearance of a group of chromatin bodies due to chromosome condensation, with chromosomes later expanding. Separate chromosomal bodies were sometimes observed at the end of metaphase. The chromosome number of *Humicola* sp seems to be

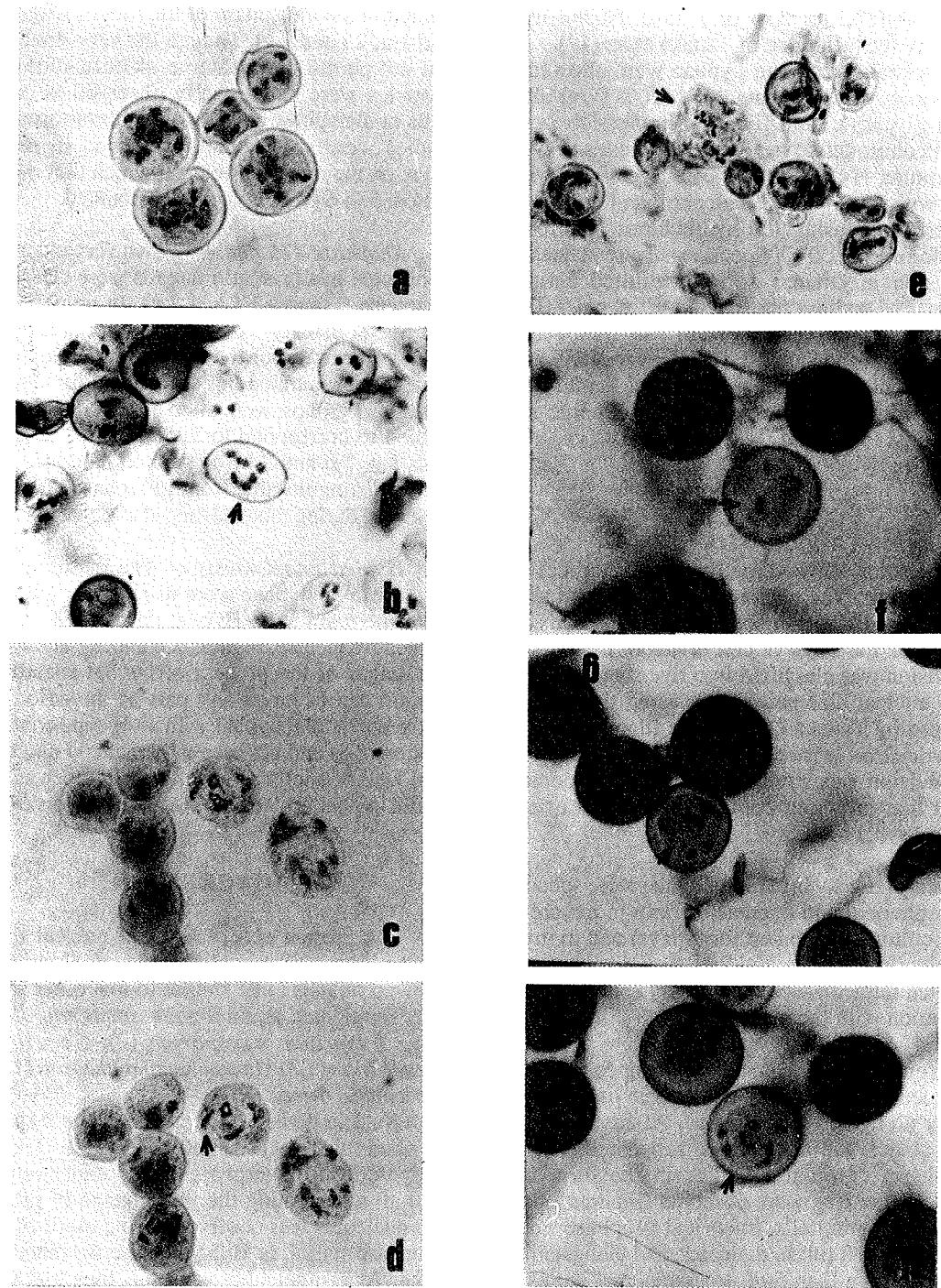


Figure 1 — Observations on nuclear division in *Humicola* sp conidia (1000X). 1.a. - Interfase and prophase nuclei; 1.b. - The arrow indicates a nucleus in an intermediate stage between prophase and metaphase; 1.c. - Prometaphase and meta- phase nuclei; 1.d. - Metaphase and anaphase nuclei. The arrow indicates rosary bead-shaped metaphase chromosomes; 1.e. - The arrow indicates 6 to 7 metaphase chromosomes; 1.f. - The arrow indicates an anaphase nucleus; 1.g. - and 1.h. - The arrow indicates a telophase nucleus.

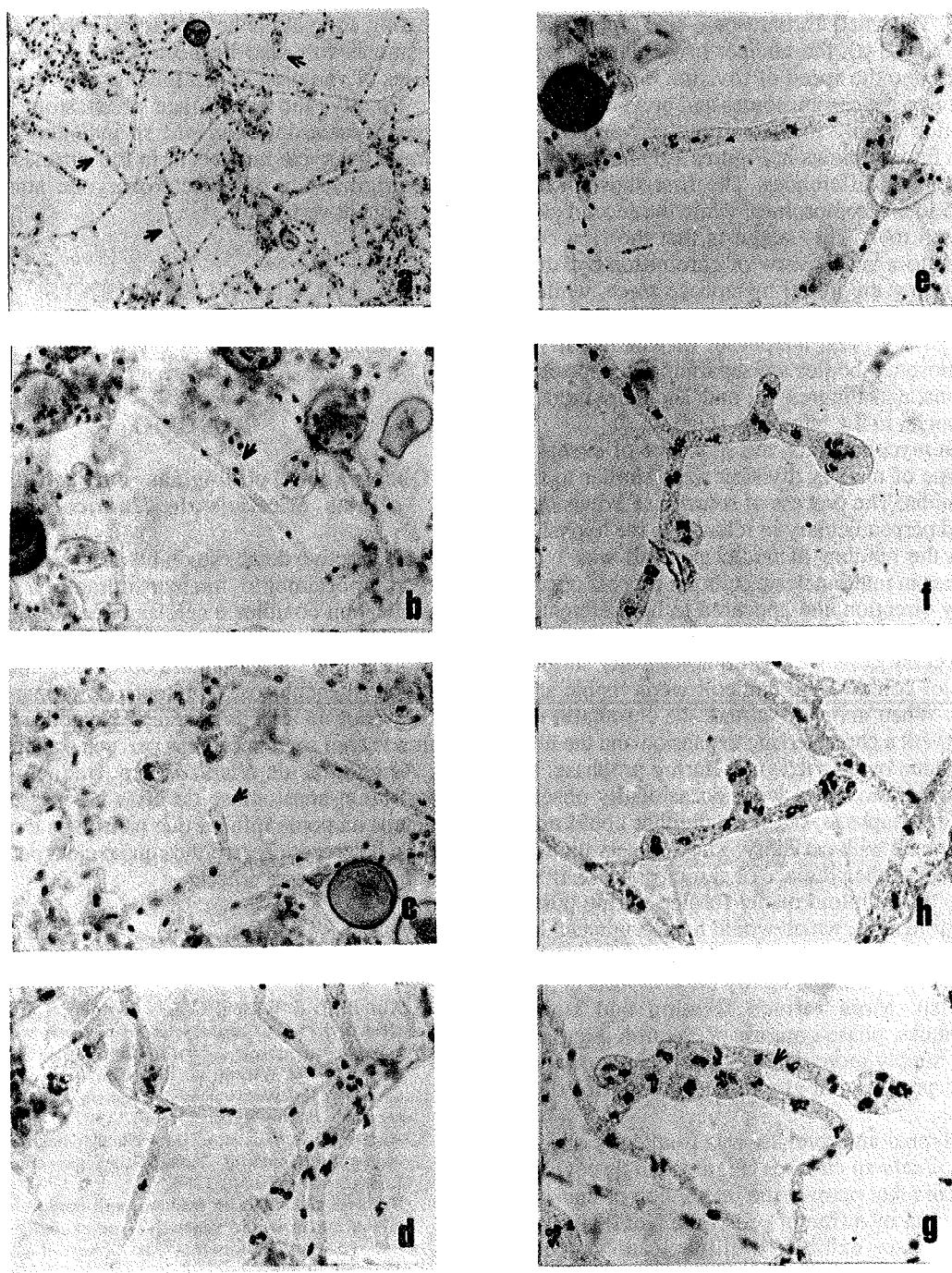


Figure 2 — Different stages of the hyphal anastomosis and nuclear division processes in mycelial cells of *Humicola* sp.
2.a. - The arrow indicates regions of hyphal anastomosis (400X); 2.b. - The arrow indicates lateral hyphal germination (1000X); 2.c. - Lateral hyphal prolongation (1000X); 2.d. - H-type bridge anastomosis with nuclear migration (1000X); 2.e. - Multinucleate mycelial cells (1000X); 2.f., 2.g and 2.h. - Nuclei of mycelial cells at different stages of division. The arrow in 2.g. - indicates hyphal anastomosis (1000X).

6 to 8. The small chromosome size (approximately 0.5 to 0.8 μ), the manner in which the nucleus divides and the speed of division made it difficult to observe the chromosomes and prevented also the detection of any mitotic irregularity. The metaphase figures shown in Figures 1.d and 1.e present appreciable differences. The first shows a chain with 5 to 6 chromosomes, while the second clearly shows 6 to 7. This suggests that the first corresponds to a lateral view of chromosome distribution during the initial metaphase stage, while the second is a frontal view. Figure 1.f shows a frontal view of a typical anaphase, in which 2 divided chromosomal bodies are separating in opposite directions, and Figures 1.g and 1.h show more distant nuclei in the telophase stage.

In mycelial cells, the sequence of events and the type of nuclear division were similar to those of conidia. The process of somatic cell division occurred perpendicularly in relation to the hyphal axis when the number of nuclei per cell was 1 to 2, whereas in multinucleate cells the process occurred in any direction and appeared to be preferentially synchronized (Figures 2.f to 2.h). Interphase nuclei of mycelial cells were morphologically similar to those of conidia, and nucleoli were visible at this stage. When division started, the chromatin mass underwent a characteristic expansion and the nucleus became oval or irregular during prophase. Five to six chromosomes were occasionally observed during metaphase, but their number could not be determined with certainty. These observations did not indicate the presence of chromosome rearrangements or of diploid nuclei formed during possible nuclear fusions, which would have originated heterokaryotic states. More detailed cytological observations are needed to clarify these aspects in *Humicola* sp. More refined fixation and staining techniques, phase-contrast or electron microscopy could supply more detailed information on the division process and chromosome behavior of this fungus.

Hyphal anastomosis was frequently observed in *Humicola* sp cultures (Figures 2.a through 2.d), a process that permits the interaction of nuclei and cytoplasm of different cells. The fact that this microorganism exhibits multinucleate vegetative structures and that anastomosis was observed between these cells suggests that this may be one of the mechanisms accounting for variation. According to Parmeter Jr. et al. (13), anastomosis is of fundamental importance in the initiation of heterokaryosis, involving hyphal fusion and movement of one or more nuclei between fused cells and

creating compatible heterokaryotic states. Heteroplasmosis can also be postulated as one of the causes of variation in this fungus.

Finally, the occurrence of anastomosis between hyphae in *Humicola* sp indicates that the parasexual cycle may occur in this species, possibly originating other heterokaryotic states and consequent variability.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by FINEP.

RESUMO

Observações citológicas em conídios e células miceliais de *Humicola* sp.

O objetivo desse estudo foi descrever aspectos do comportamento nuclear durante a divisão mitótica em conídios e células miceliais do fungo celulolítico *Humicola* sp. A sequência dos eventos mitóticos foi similar àquela observada em outros fungos filamentosos. O número de cromossomos observados no final da metáfase não pode ser determinado com segurança, mas pareceu estar entre 6 e 8. As culturas de *Humicola* sp frequentemente mostraram anastomose de hifas e a presença de núcleos na ponte hifal, o que permitiria a ocorrência de heterocariose, e indica que o ciclo parasexual pode ocorrer nessa espécie.

REFERENCES

1. Aist, J. R. & Wilson, C. L. - A study of asexual nuclear division in *Ceratocystis fagacearum* with phase contrast microscopy. *Phytopathol.*, 56: 869, 1966.
2. Aist, J. R. & Wilson, C. L. - Chromosome behavior during vegetative nuclear division in *Fusarium oxysporum*. *Phytopathol.*, 57: 801, 1967.
3. Aist, J. R. & Wilson, C. L. - Nuclear behavior in the vegetative hyphae of *Ceratocystis fagacearum*. *Amer. J. Bot.*, 54: 99-104, 1967.
4. Bakkerpigel, A. - The structure and mode of division of the nuclei in the vegetative spores and hyphae of *Endogone sphagnophila*. *Ait. Amer. J. Bot.*, 45: 404-410, 1958.
5. Barnett, H. L. & Hunter, B. H. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3^a ed. Minneapolis, Burgess, 241p., 1972.
6. Chaves, V. M. G. - *Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase*. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 60p. (Tese M.Sc.), 1982.
7. De Bertoldi, M. - Nuclear distribution in some strains

- referred to the genus *Humicola*. *Ann. Bot.*, **31**: 187-196, 1972.
- 8. De Bertoldi, M.; Lepidi, A. A. & Nuti, M. P. - Significance of DNA base composition in classification of *Humicola* and related genera. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **60**: 77-85, 1973.
 - 9. De Bertoldi, M. & Caten, C. E. - Isolation and haploidization of heterozygous diploid strains in a species of *Humicola*. *J. Gen. Microbiol.*, **91**: 63-73, 1975.
 - 10. Ellis, D. H. - Ultrastructure of thermophilic fungi. V. Conidial ontogeny in *Humicola grisea* var. *thermoides* and *H. insolens*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, **78**: 129-139, 1982.
 - 11. Knox-Davies, P. S. - Mitosis and aneuploidy in the vegetative hyphae of *Macrophomina phaseoli*. *Amer. J. Bot.*, **54**: 1290-1295, 1967.
 - 12. Lepidi, A. A.; Nuti, M. P.; De Bertoldi, M. & Santulli, M. Classification of the genus *Humicola* Traaen: II. DNA base composition of some strain within the genus. *Mycopath. Mycol. Appl.*, **47**: 153-159, 1972.
 - 13. Parmeter Junior, J. R.; Snyder, W. C. & Reichle, R. E. Heterokaryosis and variability in plant-pathogenic fungi. *Ann. Rev. Phytopathol.*, **1**: 51-78, 1963.
 - 14. Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L. M.; McDonald, K. D. & Bufton, A. W. K. - The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advan. Gen.*, **5**: 141-238, 1953.
 - 15. Subrahmanyam, A. - A new thermophilic variety of *Humicola grisea* var. *indica*. *Curr. Sc.*, **49**: 30-31, 1980.
 - 16. Tanaka, Y. - Karyological studies on variation of the rice blast fungus, *Puricularia oryzae*. Cav. Tokio, Japão. Univ. Nihon, 218p. (These Ph.D.), 1976.
 - 17. Tanaka, Y.; Murata, N. & Kato, H. - Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Puricularia*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **45**: 182-191, 1979.

Recebido para publicação em 12/2/90

**AVALIAÇÃO DE VEGETAIS COMO FONTE DE INFECÇÃO POR
PSEUDOMONAS AERUGINOSA PARA PACIENTES HOSPITALIZADOS.**
1. NÍVEL DE CONTAMINAÇÃO DOS ALIMENTOS SERVIDOS AOS PACIENTES.

Cristina M. Calderan Correa¹
Anita Tibana¹ &
Paulo Pinto Gontijo Filho¹

RESUMO

Amostras de verduras e legumes crus (200) servidos a pacientes de um hospital universitário e um hospital de oncologia foram analisadas qualitativa e quantitativamente quanto ao nível de contaminação por *Pseudomonas aeruginosa*. As cepas isoladas dos vegetais, bem como 98 isoladas de espécimes clínicos durante o período da coleta dos vegetais, foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos. *P. aeruginosa* foi isolada em 19,0% das amostras de vegetais analisadas e a metade destas apresentou contagens superiores a 100 unidades formadoras de colônia/g, apesar de terem sido submetidas à prática de sanificação com hipoclorito de sódio a 1%. As taxas de isolamentos mais elevadas foram obtidas em alface, chicória e agrião. A análise do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos demonstrou que, embora as cepas isoladas de vegetais fossem em geral mais sensíveis, a resistência à carbenicilina e à amicacina foi semelhante àquela apresentada pelas cepas isoladas de pacientes. O alto nível de contaminação dos vegetais analisados apontam no sentido de uma revisão nas rotinas de manipulação destes alimentos nos hospitais.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*, alimentos, infecção hospitalar, colonização.

INTRODUÇÃO

A transmissão de *Pseudomonas aeruginosa* no ambiente hospitaliar pode ocorrer por três vias: contato direto entre pacientes; reservatório ambiental pa-ra pacientes; colonização do paciente e subsequente infecção, sendo a última via a mais frequente (13).

Há evidências de que certos alimentos, especialmente saladas e vegetais crus, possam servir como fonte de infecção por *P. aeruginosa* (9). Os microrganismos ingeridos juntamente com os alimentos poderiam colonizar o trato gastro-intestinal

do paciente e posteriormente causar infecção (5). O editorial publicado no "New England Journal of Medicine" (15) recomendando a suspensão de verduras e vegetais crus da dieta de pacientes imunossuprimidos, demonstra a preocupação com os alimentos na epidemiologia das infecções por *P. aeruginosa*.

No Brasil, apesar da inexistência de literatura a respeito do problema, os vegetais devem assumir papel importante na transmissão de microrganismo, pois os frequentes indícios de contaminação fecal de nossas hortaliças (4, 19) levam determinados hospitais a adotarem práticas rotineiras de sani-

¹ Departamento de Microbiologia Médica, Instituto de Microbiologia da UFRJ, Rio de Janeiro-RJ CEP: 21941

ficação com derivados de cloro no preparo desses alimentos.

Na tentativa de contribuir na avaliação do papel de vegetais crus como fonte de infecção por *P. aeruginosa* para pacientes hospitalizados, o presente estudo se propõe a analisar qualitativa e quantitativamente o nível de contaminação por *P. aeruginosa* das verduras e legumes servidos a pacientes de um hospital geral e de um hospital de oncologia e determinar o perfil de sensibilidade das cepas isoladas de vegetais e pacientes frente a alguns agentes antimicrobianos com atividade pseudomonicida.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das Amostras

Alimentos — Os vegetais foram obtidas nas cozinhais do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HU), UFRJ e do Hospital de Oncologia (HO), INAMPS, ambos localizados na cidade do Rio de Janeiro. Foram estudadas 100 amostras de vegetais de cada hospital. Os vegetais foram coletadas após terem sido lavados, sanificados com solução de Milton e cortados. Após pesagem e homogeneização, alíquotas de 0,2 ml foram semeadas em triplicata em meio de ágar cetrímide e outras de 0,5 ml em dois tubos com 5 ml de caldo acetamida. As culturas foram incubadas a 42°C e examinadas sob luz ultra-violeta após 48 h. As culturas em caldo foram semeadas em ágar cetrímide somente

quando não havia crescimento em placa. A análise quantitativa foi feita a partir da semeadura em ágar observando-se a fluorescência das colônias.

Pacientes — Cepas de *P. aeruginosa* foram obtidas dos laboratórios de análises clínicas do HU-UFRJ e HO-INAMPS e corresponderam àquelas isoladas dos pacientes no período da coleta dos vegetais. Foram estudadas 54 cepas provenientes do HU-UFRJ e outras 44 do HO-INAMPS.

Caracterização Fisiológica — As cepas fluorescentes que cresceram no meio de ágar cetrímide a 42° foram identificadas através do esquema de Kantor et al. (7).

Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos — A determinação da sensibilidade das cepas de *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos foi realizada pela técnica de difusão em ágar, segundo o método descrito por Bauer et al. (1). Foram testados os seguintes antimicrobianos: amicacina (30 µg), carbencilina (100 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (30 µg), imipenem (10 µg), polimixina B (300 U) e tobraomicina (10 µg).

Avaliação Estatística — Os resultados foram analisados através do teste do qui-quadrado (3).

RESULTADOS

A frequência de isolamento de *P. aeruginosa* e a análise quantitativa da contaminação dos vegetais provenientes do HU-UFRH são mostrados na Ta-

Tabela 1 — Isolamento de *P. aeruginosa* de vegetais do Hospital Universitário - UFRJ.

Vegetais	Amostras		Nº de amostras com contagem de colônias indicada por grama (%)			
	Nº cultivado	Nº positivo (%)	10 ⁰ a 10 ¹	10 ¹ a 10 ²	10 ² a 10 ³	10 ³ a 10 ⁴
Tomate	34	6	3	- ^a	2	1
Agrião	16	5	-	2	3	-
Cebola	14	4	-	2	1	1
Alface	13	7	1	2	3	1
Pepino	9	0	-	-	-	-
Chicória	8	3	1	-	2	-
Pimentão	2	1 ^b	-	-	-	-
Cenoura	2	0	-	-	-	-
Acelga	1	1	-	1	-	-
Repolho	1	0	-	-	-	-
Total	100	27 (27,0)	5 (18,5)	7 (25,9)	11 (40,7)	3 (11,1)

a, Nenhuma.

b, Amostra positiva somente a partir do cultivo em caldo acetamida não está referida na análise quantitativa.

Tabela 2 — Isolamento de *P. aeruginosa* de vegetais do Hospital de Oncologia - INAMPS.

Vegetais	Amostras		Nº de amostras com contagem de colônias indicada por grama (%)			
	Nº cultivado	Nº positivo (%)	10 ⁰ a 10 ¹	10 ¹ a 10 ²	10 ² a 10 ³	10 ³ a 10 ⁴
Tomate	48	5	- ^a	2	2	1
Cebola	16	1	-	-	-	1
Alface	13	1 ^b	-	-	-	-
Agrião	9	2 ^b	-	1	-	-
Chicória	9	0	-	-	-	-
Pimentão	3	2	-	1	1	-
Pepino	2	0	-	-	-	-
Total	100	11 (11,0)	0 (0,0)	4 (36,4)	3 (27,3)	2 (18,2)

^a, Nenhuma.^b, Amostra positiva somente a partir do cultivo em caldo acetamida não está referida na análise quantitativa.Tabela 3 — Resistência das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes e vegetais em dois hospitais do Rio de Janeiro.

Antimicrobianos	Número de cepas resistentes (%)			
	HU - UFRJ		HO - INAMPS	
	Pacientes *n = 54	Vegetais n = 27	Pacientes n = 44	Vegetais n = 11
Gentamicina	20 (37,0)	1 (3,7)	17 (38,6)	0 (0)
Tobramicina	21 (38,9)	2 (7,4)	17 (38,6)	0 (0)
Amicacina	13 (24,1)	4 (14,8)	11 (25,0)	2 (18,2)
Carbenicilina	15 (27,8)	8 (29,6)	11 (25,0)	2 (18,2)
Ceftazidima	0 (0)	0 (0)	4 (9,1)	0 (0)
Imipenem	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Polimixina B	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Ciprofloxacina	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

*n = Número de cepas analisadas.

bela 1 e as do HO-INAMPS na Tabela 2. No HU-UFRJ, *P. aeruginosa* foi isolada de 27% dos vegetais analisados; 52% apresentaram contagens superiores a 100 UFC/g, com uma amostra de cebola contendo 6000 UFC/g e outra, de alface, 5600 UFC/g. No HO-INAMPS 11% dos vegetais apresentaram o microrganismo; 45% com contagens superiores a 100 UFC/g e duas amostras, uma de tomate e outra de cebola, com 1200 UFC/g. Todos os tipos de vegetais, exceto pepino, cenoura e repolho, forneceram *P. aeruginosa*; no entanto, as maiores taxas de isolamento foram a partir de verduras, destacando-se a contaminação das amostras de alface, chicória e agrião no HU-UFRJ ($p < 0.05$).

O comportamento das cepas de *P. aeruginosa* isoladas dos vegetais e dos pacientes frente aos an-

timicrobianos é mostrado na Tabela 3. A resistência das cepas isoladas dos vegetais e pacientes restringiu-se, basicamente, aos antimicrobianos utilizados em nosso meio para o tratamento das infecções causadas por *P. aeruginosa*. A ceftazidima e o imipenem, recentemente introduzidos no país, porém não utilizados até o período deste estudo, juntamente com a ciprofloxacina, ainda não disponível no mercado, mostraram-se ativos contra praticamente todas as cepas analisadas. A polimixina B apresentou a mesma atividade constatada para esses antimicrobianos.

As cepas isoladas dos vegetais apresentaram menores taxas de resistência aos aminoglicosídeos quando comparada àquelas dos pacientes, sobretudo por parte daquelas provenientes do HO-INAMPS ($p < 0.05$). No entanto, as taxas de resistência à amicacina foram elevadas ($p < 0.001$) e, no caso particular do HU-UFRJ, semelhantes às obtidas para as cepas dos pacientes.

DISCUSSÃO

A importância dos alimentos como fonte de patógenos hospitalares vem sendo valorizada a partir da década passada. Em 1971, Shooter et al. (17) mostraram que *E. coli*, *Klebsiella sp* e *P. aeruginosa* podiam ser cultivadas em 30-50% das amostras de alimentos servidos em hospitais. Kominos et al. (9) encontraram *P. aeruginosa* em 35% dos vegetais analisados, 46% com contagens superiores a 100 UFC/g e uma amostra com 2.200 UFC/g. Observações semelhantes foram realizadas por

Wright et al. (20) e Kominos et al.(8) nas quais foi verificada a presença do microrganismo em 46% e 30-45% dos vegetais estudados, respectivamente. Os nossos resultados mostraram taxas de isolamento menores que as descritas nesses trabalhos - 27% no HU-UFRJ e 11% no HO-INAMPS; todavia o nível de contaminação das amostras do HU-UFRJ, onde 52% apresentaram contagem maiores que 100 UFC/g e duas atingindo 6000 UFC/g e 5600 UFC/g, foi superior ao verificado na primeira publicação de Kominos et al. (9). As diferenças nas taxas de isolamento podem ser atribuídas ao fato de que as amostras mais contaminadas encontradas por aqueles autores - aipo, rabanete e tomate inteiros - não foram incluídos em nossa análise porque não constavam na dieta dos pacientes. De fato, quando se exclui esses três vegetais da análise realizada por Kominos et al. (9), a taxa de isolamento diminuiu de 35% para 26%. Entretanto, o fato mais importante a ser considerado é a sanificação anterior à coleta a que foram submetidos os vegetais neste estudo, ao contrário daqueles estudados por todos os outros autores. Shooter (16) verificou que o uso de hipoclorito de sódio a 1% (solução de Milton) reduz mas não elimina a contaminação na cozinha.

A contaminação dos vegetais é usualmente extra-hospitalar (9) e representa a própria flora ou pode resultar do solo onde são cultivados. Todavia, não está afastada a possibilidade de aquisição dos microrganismos no ambiente intra-hospitalar através de sua manipulação, como sugerem as taxas relativamente altas de resistência das cepas isoladas de vegetais à carbenicilina e à amicacina.

Os resultados da análise do perfil de sensibilidade das cepas de *P. aeruginosa* mostraram que aquelas provenientes de vegetais foram menos resistentes à maioria dos antimicrobianos quando comparadas aquelas de pacientes. Esses dados confirmam as evidências de que os microrganismos resistentes são mais comuns nos hospitais do que na comunidade (11, 14).

Taxas relativamente elevadas de resistência à carbenicilina e à amicacina - os dois antimicrobianos mais utilizados no tratamento de infecções por *P. aeruginosa* - foram verificadas entre as cepas isoladas de vegetais. Green et al. (6) analisando amostras provenientes de solo encontraram cepas desse microorganismo resistentes à carbenicilina. Resistência a este antimicrobiano também foi observada em cepas isoladas de vegetais servidos a pacientes (S.D. Kominos, apud 6). Estes resultados, à semelhança do que se constatou nesta investigação, sugerem a ocorrência de estabilização e per-

sistência das resistências na ausência de pressão seletiva dos antimicrobianos (12).

O número de microrganismos que deve ser ingerido pelo paciente para que se estabeleça a colonização intestinal varia de acordo com o regime terapêutico, a doença de base e o comprometimento do intestino (15). Buck & Cooke (2) relataram que a ingestão de até 10^6 microrganismos não está associada com a colonização em adultos saudáveis. Contudo, quando a resistência dos pacientes está reduzida, seja pelo uso terapêutico ou profilático de agentes antimicrobianos, o inóculo necessário para induzir colonização reduz-se à faixa de 10 a 100 microrganismos (18). Segundo Levison (10) o uso prolongado de antimicrobianos suprime a flora do intestino grosso e consequentemente reduz a produção de ácidos graxos de cadeia curta, elementos inibidores naturais da colonização por *P. aeruginosa*.

O alto nível de contaminação dos vegetais analisados, com cerca da metade (48,5%) das amostras positivas para *P. aeruginosa* apresentando mais de 100 unidades formadoras de colônia/g, sugere que estes alimentos possam oferecer risco de colonização e posterior infecção para os pacientes internados nesses hospitais, particularmente para aqueles em uso de antimicrobianos.

SUMMARY

Vegetables as source of *Pseudomonas aeruginosa* infections for hospitalized patients. 1. Contamination level of vegetables served in hospitals.

Samples of fresh vegetables used to feed patients of an Oncologic and an University Hospital were examined for frequency of recovery and counts of *Pseudomonas aeruginosa*. Thirty eight strains isolated from vegetables as well as 98 clinical isolates recovered during the same period of vegetable collection were also submitted to antimicrobial susceptibility testing.

P. aeruginosa was recovered from 19.0% of the vegetable samples. In spite of using 1% hypochlorite solution as sanitizer, 50% of the positive samples were found to harbour more than 100 colony forming units/g. Lettuce, endive and water cress yielded higher frequencies of isolation.

Higher susceptibility to antimicrobial agents was found among the strains recovered from vegetables although resistance to carbenicillin and amikacin was similar in both groups of strains studied.

The high contamination of the vegetable ex-

amined suggest revision in the practice of manipulation of these foods in hospitals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bauer, A. W., K. W. M. M., Sherris, J. C. & Truck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496, 1966.
2. Buck, A. C. & Cooke, E. M. The fate of ingested *Pseudomonas aeruginosa* in normal persons. *J. Med. Microbiol.*, **2**: 521-525, 1969.
3. Cochran, W.G. The X2 test of goodness of fit. *Ann. Math. Statist.*, **23**: 315-345, 1952.
4. Correa, C. M. C., Tibana, A. & Gontijo Fº, P. P. Avaliação do nível de contaminação de verduras por bactérias Gram-negativas em dois hospitais do Rio de Janeiro. In: Resumos do XXV Congresso Brasileiro de Medicina Tropical, Florianópolis, Santa Catarina, 1989.
5. Donowitz, G. R. Infection prevention in the compromised host. In: Wenzel, R. P. (ed.) Prevention and control of Hospital Infection. Williams & Wilkins, Baltimore, p. 560-577, 1987.
6. Green, S. K., Schroth, M. N., Cho, J. J., Kominos, S. D. & Vitanza-Jack, V. B. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol.*, **28**: 987-991, 1974.
7. Kantor, L. T., Kominos, S. D. & Yef, R. B. Identification of monofementative Gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *Am. J. Med. Technology*, **41**: 3-9, 1975.
8. Kominos, S. D., Copeland, C. E. & Delenko, C. A. *Pseudomonas aeruginosa* from vegetables, salads, and other foods served to patients with burns. In: Young, V. M. (ed.). *Pseudomonas aeruginosa: ecological aspects and patient colonization*. Raven Press, New York, p. 59-73, 1977.
9. Kominos, S. D., Copeland, C. E., Grosiak, B. & Postic, B. Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Appl. Microbiol.*, **24**: 567-570, 1972.
10. Levison, M. E. Factors influencing colonization of the gastrointestinal with *Pseudomonas aeruginosa*. In: Young, V. M. (ed.). *Pseudomonas aeruginosa: ecological aspects and patient colonization*. New York, Raven Press, p. 97-109, 1977.
11. Martins, F. M. Avaliação da relação de resistência entre antimicrobianos e anti-sépticos em *Pseudomonas aeruginosa*. Tese de Mestrado. Instituto de Microbiologia, UFRJ, 1989.
12. McGowan Jr. J. E. Antimicrobial resistance in hospital organisms and its relation to antibiotic use. *Rev. Infect. Dis.*, **5**: 1033-1048, 1983.
13. Morrison, A. J. & Wenzel, R. P. Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.*, **6**: 627-642, 1984.
14. Pollack, M., Charache, P., Nieman, R. E., Jett, M. P., Reinhardt, J. A. & Haady, P. J. J r. Factors influencing colonization and antibiotic-resistance patterns of Gram-negative bacteria in hospital patients. *Lancet*, **2**: 668-671, 1972.
15. Remington, J. S. & Schimpff, S. C. Please Don't eat the salads. *New Engl. J. Med.*, **304**: 433-435, 1981.
16. Shooter, R. A. Bowel colonization of hospital patients by *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *Proc. Roy. Soc. Med.*, **64**: 27-28, 1971.
17. Shooter, R. A., Faiers, M. C., Cooke, E. M., Breaden, A. L. & O'Farrel, S.M. Isolation of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella* from foods in hospitals, canteens, and schools. *Lancet*, **2**: 390-393, 1971.
18. Van Dcr Waan, D. Colonization resistance of the digestive tract: clinical consequences and implications. *J. Antim. Chemoth.*, **10**: 263-270, 1982.
19. Vessoni Penha, T. C., Abe, L. E., MAachosvilli, I. A., Colombo, A. J. & Baruffaldi, R. Condições higiênico-sanitárias de hortaliças em restaurantes industriais. In: Programa e Resumos do XIV Congresso Brasileiro de Microbiologia. Viçosa, Minas Gerais, 1987.
20. Wright, C., Kominos, S. D. & Yee, R. B. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Appl. Environ. Microbiol.*, **31**: 453-454, 1976.

Recebido para publicação em 19/2/90

AVALIAÇÃO DE VEGETAIS COMO FONTE DE INFECÇÃO
POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PARA PACIENTES
HOSPITALIZADOS. 2. DETECÇÃO DE MARCADORES
EPIDEMIOLÓGICOS EM CEPAS PROVENIENTES DE ALIMENTOS E
DE PACIENTES.

Cristina M. Calderan Correa¹
Anita Tibana¹ &
Paulo Pinto Gontijo Filho¹

RESUMO

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de verduras e legumes crus servidos a pacientes de um hospital universitário e um hospital do oncologia, bem como as isoladas de espécimes clínicos durante o período da coleta dos vegetais foram identificadas fenotipicamente através da produção de piocinas e do antígeno somático, com o objetivo de avaliar o potencial desses alimentos como fonte de infecção pelo microrganismo. Os resultados da tipagem sorológica e da piocinotipagem evidenciaram a presença de cepas de *P. aeruginosa* com características fenotípicas idênticas tanto entre as amostras de vegetais como entre as de pacientes. Enquanto no hospital universitário cepas de sorotipo 04 e piocinotipo PT10/b foram detectadas tanto nos espécimes clínicos como nos vegetais, no hospital de oncologia constatamos cepas de fenótipos 01-PT 22/e, 02a-PT 10/a, 02a-PT10/b, 04-PT10/a 011-PT10/a e 011-PT10/b nos dois grupos de amostras. Os dados registrados permitem sugerir que os vegetais representam uma fonte de infecção endêmica por *P. aeruginosa* para pacientes hospitalizados.

Palavras Chave: *Pseudomonas aeruginosa*, infecção hospitalar, marcador epidemiológico.

INTRODUÇÃO

O controle das infecções hospitalares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* depende, em grande parte, do reconhecimento das fontes e dos mecanismos de transmissão desse microrganismo, através da tipagem das cepas obtidas de diferentes procedências (4).

Os seguintes sistemas de determinação de marcadores epidemiológicos de *P. aeruginosa* podem ser utilizados com esse propósito: biotipagem, espectro de sensibilidade aos antimicrobianos, bacteriosagotipagem, perfil de plasmídeos, sorotipagem e piocinotipagem (1). A piocinotipagem usada junta-

mente com a sorotipagem permitem uma maior discriminação e proporção de cepas tipáveis (10).

Neste estudo cepas de *P. aeruginosa* isoladas de vegetais servidos a pacientes hospitalizados e outras isoladas dos pacientes foram classificadas através de sorotipagem e piocinotipagem com objetivo de estabelecer possível correlação entre os tipos provenientes de vegetais e aqueles de espécimes clínicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Origem das amostras — As cepas provenien-

1. Departamento de Microbiologia Médica — Instituto de Microbiologia da UFRJ — Rio de Janeiro — RJ — CEP: 21941

tes de 38 amostras de vegetais e de 96 pacientes corresponderam àquelas isoladas por Correa *et al.* (2).

Sorotipagem — As cepas de *P. aeruginosa* foram sorotipadas através do sistema utilizado no "Central Public Health Laboratory" (CPHL), Colindale, Londres (11) que define 21 sorotipos. A produção dos anti-soros foi realizada conforme o "Manual for Epidemiological Typing of *Pseudomonas aeruginosa* of the Gram-Negative Sepsis Unit" (CPHL).

Piocinotipagem — A classificação das cepas de *P. aeruginosa* de acordo com a produção de piocinas foi feita pelo método de Fyfe *et al.* (4), utilizando-se oito cepas indicadoras de tipo (1-8) e cinco indicadoras de subtipo (A-E).

RESULTADOS

As Tabelas 1 e 2 mostram, respectivamente, as freqüências dos sorotipos e piocinotipos das cepas de *P. aeruginosa*, isoladas do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HU), UFRI e do Hospital de Oncologia (HO), INAMPS.

Tabela 1 — Distribuição dos sorotipos O das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de dois hospitais do Rio de Janeiro, Brasil.

Sorotipo O	Número de cepas (%)			
	HU-UFRJ		HO-INAMPS	
	Pacientes *n = 52	Vegetais n = 27	Pacientes n = 44	Vegetais n = 11
1	3 (5,8)	1 (3,7)	3 (6,9)	3 (27,3)
2a	2 (3,8)	2 (7,4)	4 (9,0)	2 (18,2)
2b	**	-	2 (4,5)	-
2a, 2b	1 (1,9)	-	1 (2,3)	-
2a, 16	2 (3,8)	-	-	-
3	4 (7,7)	1 (3,7)	-	-
4	6 (11,5)	6 (22,2)	13 (29,6)	2 (18,2)
3, 4	-	-	1 (2,3)	-
5d	-	1 (3,7)	1 (2,3)	-
6	1 (1,9)	11 (40,8)	1 (2,3)	-
6c	-	-	1 (2,3)	-
6d	1 (1,9)	-	-	-
9	1 (1,9)	1 (3,7)	-	-
10	3 (5,8)	1 (3,7)	-	-
11	14 (26,9)	-	11 (25,0)	1 (9,0)
16	7 (13,5)	1 (3,7)	4 (9,0)	-
PA***	5 (9,7)	2 (7,4)	2 (4,5)	3 (27,3)
AA****	2 (3,8)	-	-	-

*n = Número de cepas analisadas.

**, nenhuma.

***, PA, poli-aglutinável.

****, AA, auto-aglutinável.

Tabela 2 — Distribuição dos piocinotipos das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de dois hospitais do Rio de Janeiro, Brasil.

Piocinotípico	Número de cepas (%)			
	HU-UFRJ	HO-INAMPS	HU-UFRJ	HO-INAMPS
	Pacientes *n = 64	Vegetais n = 40	Pacientes n = 54	Vegetais n = 18
1	21 (32,8)	15 (37,5)	13 (24,0)	1 (5,6)
3	6 (9,4)	6 (15,0)	3 (5,6)	****
5	3 (4,7)	-	-	1 (5,6)
6	-	2 (5,0)	-	-
9	3 (4,7)	-	-	-
10	17 (26,6)	3 (7,5)	30 (55,6)	8 (44,4)
16	-	1 (2,5)	-	-
17	-	1 (2,5)	-	1 (5,6)
22	1 (1,6)	1 (2,5)	3 (5,6)	22 (33,3)
27	-	1 (2,5)	-	-
28	-	-	1 (1,8)	-
31	-	1 (2,5)	1 (1,8)	-
34	1 (1,6)	-	-	-
35	1 (1,6)	-	-	-
37	-	1 (2,5)	-	-
48	1 (1,6)	-	-	-
49	1 (1,6)	-	-	-
50	2 (3,1)	-	-	-
64	1 (1,6)	-	-	-
NC**	3 (7,8)	5 (12,5)	2 (3,7)	1 (5,6)
NT***	10 (1,6)	3 (7,5)	1 (1,8)	-

*n = Número de cepas analisadas.

**NC, Cepas não classificadas, que mostraram reação duvidosa frente a algumas cepas indicadoras.

***NT, Cepas não tipadas que apresentaram padrões diferentes daqueles descritos em Fyfe *et al.* (4)

****, Nenhuma.

A relação dos marcadores epidemiológicos mais freqüentes entre as cepas de cada grupo de amostras e aqueles comuns tanto nas cepas dos pacientes como nas das vegetais está descrita na Tabela 3, na qual, em relação aos piocinotipos, também foram considerados os respectivos subtipos.

DISCUSSÃO

Em estudos epidemiológicos nos quais se avaliam reservatórios potenciais de infecções é essencial a tipagem do microrganismo, de forma que se possa associar os isolamentos realizados a partir de pacientes e das fontes investigadas (15).

Nesta investigação, constatamos que o sorotípo 011 presente em 22,6% dos espécimes clínicos e o sorotípo 04 (19,8%) foram os mais freqüentes. Este resultado assemelha-se aos obtidos por Poh *et al.* (12) que encontraram os mesmos sorotipos

Tabela 3 — Marcadores epidemiológicos das cepas de *P. aeruginosa* isoladas de dois hospitais do Rio de Janeiro, Brasil.

HU - UFRJ				HO - INAMPS			
Pacientes		Vegetais		Pacientes		Vegetais	
Modelos	Nº de cepas	Modelos	Nº de cepas	Modelos	Nº de cepas	Modelos	Nº de cepas
03 - PT9/v*	2	02a - PT1/b	2	01 - PT22/e	3	01 - PT22/e, 22/n	2
04 - PT10/b	2	04 - PT10/b	2	02a - PT10/a	1	01 - PT22/q	1
011 - PT1/h	3	06 - PT1/e	3	02a - PT10/b	1	02a - PT10/a	1
011 - PT10/b	5	06 - PT3/e	4	04 - PT1/b	2	02a - PT10/a, 10/b	1
011 - PT10/h	2			04 - PT1/h	3	04 - PT10/a	2
016 - PT1/c	2			04 - PT10/b	3	011 - PT10/a, 10/b	1
016 - PT10/a	2			04 - PT10/h	3		
				04 - PT10/h, 10/a	2		
				011 - PT10/a	3		
				011 - PT10/b	8		
				016 - PT10/a	2		

* = Sorotipo O - piocinotípico/subtipo.

como prevalentes, mas as freqüências são superiores às encontradas no CPHL (14), onde o sorotipo 011 correspondeu a 13,2% e o sorotipo 04 a apenas 3,2% das cepas testadas.

Em relação às cepas isoladas dos vegetais verificamos que os sorotipos 06 (29,0%) e 04 (21,0%) foram os mais freqüentemente encontrados. Não dispomos de dados referentes a cepas isoladas de vegetais tipadas pelo sistema do CPHL, mas estudos com cepas provenientes de água potável, água de piscina e dejetos revelaram o sorotipo 06 como prevalente (9).

A maioria das cepas estudadas (91,0%) foi tipada através da produção de piocinas. Outros autores (4, 8, 12) empregando a mesma técnica, conseguiram taxas que variaram de 83,9% a 99,0%. Vale ressaltar que essas análises citadas foram realizadas unicamente com cepas isoladas de espécimes clínicos. Considerando as nossas cepas separadamente de acordo com a origem, verificamos elevação no número de cepas tipadas oriundas dos pacientes (94,1%) e redução no grupo dos vegetais (84,5%). No tocante às cepas de vegetais, os resultados obtidos confirmam aqueles de Kiss *et al.* (5) mostrando que aquelas provenientes de fontes inanimadas são menos tipáveis do que as isoladas dos pacientes.

Analizando os resultados obtidos no soro e piocinotipagem documentamos a presença de cepas de *P. aeruginosa* com os mesmos caracteres fenotípicos em amostras de vegetais e de pacientes. Enquanto no HU-UFRJ cepas de sorotipo 04 e piocinotípico PT10/b foram detectados tanto nos espécimes clínicos como nos vegetais, no HO-

INAMPS constatamos cepas de fenótipos 02a-PT10/a, 02a-PT10/b, 04-PT10/a, 011-PT10/a, 011-PT10/b e 01-PT22/e nos dois grupos de amostras. Vale salientar a ocorrência do piocinotípico PT22 por não estar incluído entre os tipos mais comuns descritos na literatura.

Kominos *et al.* (7) foram os primeiros investigadores a proporem as verduras como fonte de infecção de *P. aeruginosa* para pacientes hospitalizados, mostrando que alguns piocinotípos dos espécimes clínicos eram idênticos àqueles recuperados dos vegetais.

As evidências de que os alimentos podem ser a fonte de infecção de patógenos oportunistas como a *P. aeruginosa* levou pesquisadores como Remington & Schimpff (13) e Donowitz (3) a recomendarem para pacientes de alto risco o uso de alimentos cozidos ou processados, com baixo número de microrganismos, e especialmente a exclusão dos vegetais crus das suas dietas. Endossando tais indicações Kominos *et al.* (6) já registravam a diminuição na taxa de "sepsis" causada por *P. aeruginosa*, de 32,0% para 6,25%, em pacientes queimados submetidos a controle de dieta.

Nesta investigação verificamos que os vegetais continham algumas cepas com marcadores fenotípicos idênticos àquelas provenientes de pacientes infectados, o que sugere que esses alimentos podem representar uma fonte de infecção pelo microrganismo. O processo de infecção poderia ser, então, facilitado pelo uso freqüente de antimicrobiano que favoreceria a colonização dos microrganismos ingeridos na mucosa intestinal do paciente.

SUMMARY

Vegetables as source of *Pseudomonas aeruginosa* infections for hospitalized patients. 2. Epidemiological markers of vegetables and patients strains.

Strains of *P. aeruginosa* isolated from fresh vegetables used to feed patients of an University and Oncologic Hospital as well the clinical isolates during the same period of vegetable collection were serotyped and assayed for pyocin production in order to evaluate the role of vegetables as source of this microorganisms.

The pyocin typing and serotyping of clinical strains revealed some types identical to those recovered from vegetables. Among those found in the University Hospital serotype 04 and pyocin type PT10/b were detected in vegetables and in clinical specimens while types 01-PT22/e, 02a-PT10/a, 02a-PT10/b, 04-PT10/a, 011PT10/a and 011-PT10/b, were common in both groups of strains isolated in the Oncologic Hospital.

Our results suggest that vegetables represent a source of endemic infection with *P. aeruginosa* for hospitalized patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brokopp, C. D. & Farmer III, J. J. Typing methods for *Pseudomonas aeruginosa*. In: Doggett, R. G. (ed.). *Pseudomonas aeruginosa: Clinical Manifestation of Infection and Current Therapy*. Academic Press, Inc, London, p. 89-133, 1979.
2. Correa, C. M. C., Tibana, A. & Gontijo Filho, P. Avaliação de vegetais como fonte de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* para pacientes hospitalizados. I. Nível de contaminação dos alimentos servidos aos pacientes. *Rev. Microbiol.* 21(3): 238-242, 1990
3. Donowitz, G. R. Infection prevention in the compromised host. In: Wenzel, R. P. (ed.). *Prevention and Control of Hospital Infection*, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 560-577, 1987.
4. Fyfe, J. A. M., Harris, G. & Govan, J. R. W. Revised pyocin method for *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.* 20: 47-50, 1984.
5. Kiss, P., Lantos, J., Lányi, B. & Fodré, Z. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water by serogrouping phage sensitivity and pyocin pattern. *Acta Microbiol. Hung.*, 32: 99-106, 1985.
6. Kominos, S. D., Copeland, C. E. & Delenko, C. A. *Pseudomonas aeruginosa* from vegetables, salads, and other foods served to patients with burns: In: Young, V. M. (ed.). *Pseudomonas aeruginosa: ecological aspects and patients colonization*. Raven Press, New York, p. 59-73, 1977.
7. Kominos, S. D., Copeland, C. E. & Grosiak B. & Postic, B. Introduction of *Pseudomonas aeruginosa* into a hospital via vegetables. *Appl. Microbiol.*, 24: 567-570, 1972.
8. Komiyama, K., Habbick, B., Martin T & Tumber, S. K. Characterization by pyocine typing and serotyping of oral and sputum strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *Can. J. Microbiol.*, 33: 221-225, 1987.
9. Lányi, B. & Bergan, T. Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Bergan, T. & Noris, J. R. (ed.). *Methods in Microbiology*, vol. 10. Academic Press, Inc, London, p. 93-168, 1978.
10. Pitt, T. L. State of the art: typing *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Hosp. Infect.*, 1: 193-199, 1980.
11. Pitt, T. & Erdman, Y. J. Te especificity of agglutination reaction of *Pseudomonas aeruginosa* with O antisera. *J. Med. Microbiol.*, 11: 15-23, 1977.
12. Poh, C. L., Yap, E. H., Tay, L. & Bergan, T. Plasmid profiles compared with serotyping and pyocin typing for epidemiological surveillance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Microbiol.* 25: 109-114, 1988.
13. Remington, J. S. & Schimpff, S. C. Please don't eat the salads. *New Engl. J. Med.*, 304: 433-435, 1981.
14. Strickland, M. A., Gaston, M. A. & Pitt, T. L. Comparison of polyclonal rabbit antisera with monoclonal antibodies for serological typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 768-769, 1987.
15. Wenzel, R. P. Hospital-acquired pneumonia: Overview of the current state of the art for prevention and control. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 8(1): 56-60, 1989.

Recebido para publicação em 19/2/90

ASPECTOS MORFO-FISIOLÓGICOS, FATORES DE VIRULÊNCIA E SENSIBILIDADE A ANTIFÚNGICOS DE AMOSTRAS DE *CANDIDA ALBICANS*, SOROTIPOS A E B, ISOLADAS EM SÃO PAULO, BRASIL.

Edson Marden Bonifácio e Souza¹
Claudete Rodrigues Paula¹
Adhemar Purchio¹
Walderez Gambale¹
Benedito Corrêa¹
& Arlete Emily Cury²

RESUMO

Trinta amostras de *C.albicans*, 15 sorotipos A e 15 B, isoladas de diferentes materiais clínicos (São Paulo, Brasil), foram estudadas quanto aos aspectos morfológicos, fisiológicos, fatores de virulência "in vitro" (produção de proteinases e fosfolipases) e "in vivo" (inoculação experimental em coelhos) e sensibilidade a drogas antifúngicas (Anfoterinal, Miconazol e Cetoconazol). A produção de proteinases em relação ao tempo de isolamento das amostras, a correlação entre produção de proteinases, e fosfolipases e a sensibilidade aos antifúngicos foram os resultados significantes.

INTRODUÇÃO

Até a década de 30, doenças humanas associadas às espécies de *Candida* eram bem mais raras e a candidose sistêmica era praticamente desconhecida. Na atualidade, as candidoses superficial e sistêmica, constituem problema de saúde pública (16). Esta levedura é encontrada como um comensal ou patógeno, que vive nos homens e animais, bem como no solo e na água, sendo raramente encontrada na atmosfera (17,23).

No homem, em condições normais, *C.albicans* faz parte de sua microbiota e a candidose emerge quando alguns fatores predisponentes, patológicos, fisiológicos, mecânicos e iatrogênicos, modificam o relacionamento que ocorre entre o hospedeiro e a microbiota autóctone (9,21).

A patogenicidade de *C.albicans* depende, segundo a literatura, mais do hospedeiro do que do fungo. Os fatores que tornam esta levedura capaz de penetrar e se multiplicar dentro do tecido do hospedeiro têm sido muito discutidos. Entretanto, o significado patogênico em função de fatores de virulência, tais como sorotipos, toxinas, enzimas e aspectos morfológicos, estão ainda sendo avaliados (3,16).

Na atualidade, apesar da candidose ser considerada um problema de saúde pública, ser a micose mais frequente em todo o mundo, e se apresentar como um "sinalcero biológico" para o hospedeiro, vários aspectos com relação a biologia das diferentes espécies *Candida*, e de *C.albicans*, devem ser melhor estudados, assim como a atividade antifúngica de vários fármacos contra essas leveduras.

¹ Universidade de São Paulo, Deptº de Microbiologia, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, 05508 São Paulo SP, Brasil
² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Deptº de Análises Clínicas e Toxicológicas, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, 05508 São Paulo SP, Brasil

Considerando os aspectos assinalados, tem-se por objetivos neste trabalho o estudo das características morfológicas, fisiológicas, da virulência "in vitro" e "in vivo" e da sensibilidade a drogas antifúngicas, de amostras regionais, sorotipos A e B.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de C. albicans — Neste trabalho foram utilizadas trinta amostras de *C. albicans* isoladas de vários materiais clínicos, 17 de coleção de culturas e 13 recém-isoladas, e que haviam sido identificadas e sorotipadas em pesquisa anterior (3).

Características morfológicas — Macro e micromorfologia em meio sólido e líquido: forma, tamanho e tipo de reprodução vegetativa; microcultivo em lâmina (pesquisa de micélio verdadeiro, pseudomicélio, clamidoconídio, blastoconídio e arranjo dos blastoconídios e pseudomicélio); pesquisa do efeito Reynolds-Braude (tubo germinativo); (11).

Características fisiológicas — Reação do azul do diazonio B (DBB); fermentação de açúcares: dextrose, maltose e sacarose; assimilação de fontes de carbono: amido solúvel, celobiose dextrose, eritritol, galactose, inositol, lactose, maltose, rafinose e sacarose; assimilação de fontes de nitrogênio: peptona e nitrato de potássio; reação de cloreto de 2-3-5 trifentiltetrazólio; (7,11).

Pesquisa de proteinase (22). Foi preparado meio básico, enriquecido com vitaminas, e como fonte de proteína, albumina bovina-fração V (Difco). Após o tempo de incubação (37°C - 48 horas), adiciona-se solução corante (negro amido e ácido acético) sobre as amostras e, logo em seguida, após o esgotamento de solução corante, adicionou-se a solução reveladora, contendo ácido acético, com o objetivo de revelar a presença de proteinases e dimensionar os halos formados.

Pesquisa de fosfolipases (19). Foi preparado meio básico contendo ágar Sabouraud dextrose, enriquecido com gema estéril de ovo. As amostras foram incubadas a 37°C , por 48 horas. As leituras foram feitas diariamente, com objetivo de se evidenciar a formação e o tamanho dos halos.

Inoculação experimental em coelhos (15). Trinta

coelhos, machos, adultos, da raça Nova Zelândia, foram inoculados com 30 amostras de *C. albicans* (5.106 cels/kg), por via endovenosa. Os animais foram mantidos em observação por 60 dias.

Estudo da viabilidade das células fúngicas — Foi realizado segundo Corrêa et alii (1986), para cada amostra a ser inoculada.

Estudo da sensibilidade a drogas antifúngicas — As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD; Difco), a 30°C durante 24 horas. A partir destas culturas foram preparadas suspensões em tampão de fosfato 0,01 M contendo 10^6 células/ml (12).

Para estudo da concentração inibitória mínima (CIM), cada droga foi inicialmente solubilizada em volume conhecido de dimetil sulfóxido a 10%. Em seguida, procedeu-se à diluição seriada ao dobro em "yeast nitrogen base" (YNB; Difco), suplementado e tamponado (12), a fim de se obter concentrações finais variáveis de 32 μg a 0,006 μg da droga por ml de ágar (1%) YNB, suplementado e tamponado. Cada meio foi adequadamente semeado e incubado, conforme trabalho anterior (5). As drogas utilizadas foram: anfotericina B (Squibb), nitrato de miconazol e cetoconazol (Johnson & Johnson).

Métodos estatísticos empregados na análise dos principais resultados — Testes de "Mann-Whitney" e de "Kendall.Rank Correlation".

RESULTADOS

Macromorfologia

Em meio sólido — As colônias apresentaram crescimento em média de 4,0 cm de diâmetro e cor branco-amarelada; 19 amostras (63,3%) com superfície lisa e 11 (36,7%) com superfície rugosa; 27 amostras (90%) eram opacas e 3 (10%) brilhantes; 17 (56,6%) com bordos regulares, 3 (10%) franjadas e 1 com bordo irregular.

Em meio líquido — Todas as amostras formaram sedimento, 22 (73,3%) formaram resíduo e 13 (43,3%) película. Nenhuma formou anel ou ilhota.

Micromorfologia

Em meio sólido (microcultivo) — Todas as amostras apresentaram blastoconídios e pseudomicélio; 7 destas (23,3%) formaram micélio verdadeiro; 25

(83,3%) clamidoconídios; 16 (53,3%) arranjo tipo micotorula, 3 (10%) tipo candida e 11(36,6%) apresentaram blastoconídios dispostos de forma irregular.

Com relação ao tempo de formação de clamidoconídios observou-se que: 16 amostras (53,3%) os apresentaram em 24 horas; 22 (73,3%) em 48 horas e em 1 amostra, estes eram raros; 24 (80%) em 72 horas, e em 2 destas, estes eram raros; 25 (83,3%) em 96 horas, e em 3 destas amostras, estes eram escassos.

Em meio líquido — com relação ao estudo da forma, tamanho e tipo de reprodução vegetativa, de modo geral, observaram-se células redondas, ovais-alongadas, medindo em média 3 μm -5 μm por 4 μm - 7 μm de diâmetro, com brotamento unipolar e multipolar, em base estreita.

Pesquisa do efeito Reynolds-Braude (tubo germinativo) — com relação ao tempo de formação de tubos germinativos, verificou-se que após 1 hora de incubação, 26 amostras (86,6%) apresentavam estas estruturas; 29 (96,6%) em 2 horas e após 3 horas de incubação todas as amostras apresentaram tubos germinativos.

Estudos das características fisiológicas

Reação ao azul de diazônio (D.B.B) — Nenhuma amostra revelou cor vermelha, característica da reação D.B.B. positiva.

Fermentação de açúcares (zimograma) — Todas as amostras fermentaram a dextrose e maltose com produção de gás, e 3 amostras (10%) fermentaram a sacarose.

Assimilação das fontes de carbono e nitrogênio — Todas amostras de *C. albicans* assimilaram amido solúvel, dextrose, galactose, maltose, e sacarose. Nenhuma amostra assimilou celobiose, eritritol, inositol, lactose e rafinose, e também não assimilaram o nitrato de potássio.

Reação ao cloreto de 2,3,5, - trifeniltetrazólio (T.T.C.) — Somente uma amostra (3,3%) não reduziu o T.T.C. As demais amostras (96,7%) reduziram esta substância, em grau variável, desenvolvendo cores diferentes: rosa-claro (3,3%); rosa-claro com os bordos rosa-escuro (76, 6%); rosa (3,3%); rosa-escuro com bordos claros (6,6%); rosa-escuro (3,3%) e vermelho-claro (3,3%).

Pesquisa de enzimas extracelulares (fatores de virulência "in vitro").

Pesquisa de proteinases — Dezenove amostras (63,3%) produziram proteinases, destas, 56,6% formaram halos em 24 horas e 6,6% em 48 horas.

Pesquisa de fosfolipases — Vinte e duas amostras (73,3%) produziram fosfolipases, destas, 60% formaram halos em 24 horas e 13,2% em 48 horas.

Inoculação experimental, via venosa, em coelhos (fator de virulência "in vivo") — Dezenove animais (63,3%) foram ao óbito, sendo que 14 (46,69%) morreram em até 6 dias, 5 (16,6%) entre 8-20 dias, e 11 (36,6%) so-breviveram até 60 dias.

Estudo da sensibilidade à drogas antifúngicas "in vitro" — Considerando-se concentrações variáveis das drogas de 0,06 a 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, observou-se que: frente à anfotericina B, no teste de CIM, todas as amostras foram sensíveis à concentração de 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Em concentrações inferiores, as amostras do sorotipo B foram, com freqüência, mais sensíveis que as do A. Em termos de percentagem acumulada, 26,6% das sorotipo B, e nenhuma das A, sofreram inibição do crescimento frente a 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 33,2% das B e 13,3% das A foram sensíveis a 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; 46,5% das B e 13,3% das A foram inibidas em 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e 80% das B e 53,3% das A o foram em 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Tal diferença foi menos acentuada no teste de CFM, em concentrações variáveis de 1 a 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Esta última foi letal para cerca de 80% das amostras do sorotipo B e 73% das A.

Para 2 amostras do sorotipo B a CIM do cetoconazol foi de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para as demais amostras esse agente não demonstrou atividade inibitória nas concentrações utilizadas. Nestas concentrações, o cetoconazol não foi fungicida para qualquer das amostras estudadas.

O miconazol apresentou CIMS na faixa de 16 a >32 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para 20% das amostras do sorotipo B e 6,6% das A, a CIM foi de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Na concentração de 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, essa droga foi fungistática para cerca de 46% das sorotipo B e 40% das A. Entretanto, não demonstrou atividade fungicida nas concentrações empregadas.

Relação dos principais resultados com os testes estatísticos (Tabela 1)

Tabela 1 — Aspectos morfo-fisiológicos, fatores de virulência e sensibilidade a antifúngicos de amostras de *Candida albicans*, sorotipos A e B, isoladas em São Paulo, Brasil.

AMOSTRAS	SOROTIPOS	SUPERFÍCIE DA COLÔNIA	CLAMÍDOCONDÍOS	TUBOS GERMINATIVOS	PROTEINASES*	FOSFOLIPASES*	MORTE DOS ANIMAIS (EM DIAS)	ANFOTERICINA B (ug/ml) CIM	CFM
1c	A	lisa	+	+	-	-	10	2.0	16.0
2c	A	rugosa	+	+	5.0 x 5.0	-	*	2.0	16.0
3c	B	lisa	+	+	6.0 x 6.0	-	02	0.1	1.0
4c	A	lisa	-	+	8.0 x 8.0	3.0 x 3.0	*	0.2	4.0
5c	B	rugosa	+	+	7.0 x 7.0	2.0 x 2.0	08	0.2	16.0
6c	A	lisa	+	+	1.0 x 1.0	3.0 x 3.0	01	1.0	16.0
7c	B	lisa	+	+	10.0 x 10.0	4.0 x 4.0	06	0.1	4.0
8c	B	lisa	+	+	-	-	06	2.0	2.0
9c	A	lisa	+	+	10.0 x 10.0	2.0 x 2.0	*	2.0	2.0
10c	B	rugosa	+	+	7.0 x 7.0	1.0 x 1.0	*	0.1	16.0
11c	B	rugosa	-	+	6.0 x 6.0	3.0 x 3.0	08	0.1	32.0
12c	A	rugosa	+	+	-	1.0 x 1.0	*	0.2	4.0
13c	A	rugosa	-	+	3.0 x 3.0	2.0 x 2.0	20	1.0	8.0
15c	B	rugosa	+	+	10.0 x 10.0	3.0 x 3.0	05	2.0	16.0
16c	B	lisa	-	+	5.0 x 5.0	2.0 x 2.0	05	2.0	16.0
17c	B	rugosa	+	+	1.0 x 1.0	2.0 x 2.0	*	1.0	32.0
18c	B	rugosa	-	+	-	2.0 x 2.0	*	1.0	32.0
19r	A	lisa	+	+	2.0 x 2.0	-	03	2.0	32.0
20r	A	lisa	+	+	4.0 x 4.0	2.0 x 2.0	02	1.0	32.0
22r	A	lisa	+	+	-	0.5 x 0.5	02	1.0	16.0
23r	A	rugosa	+	+	-	1.0 x 1.0	02	2.0	16.0
24r	A	lisa	+	+	9.0 x 9.0	2.0 x 2.0	14	2.0	32.0
25r	A	lisa	+	+	-	-	*	1.0	32.0
28r	B	lisa	+	+	5.0 x 5.0	-	04	1.0	8.0
29r	B	lisa	+	+	-	-	05	0.5	8.0
30r	B	lisa	+	+	-	3.0 x 3.0	05	0.5	4.0
31r	A	lisa	+	+	-	3.0 x 3.0	04	1.0	4.0
32r	B	lisa	+	+	3.0 x 3.0	3.0 x 3.0	*	1.0	8.0
37r	B	lisa	+	+	-	1.0 x 1.0	*	1.0	16.0
39r	A	rugosa	+	+	2.0 x 2.0	2.0 x 2.0	*	2.0	16.0
Padrão									
Mundial	A	lisa	+	+	10.0 x 10.0	4.0 x 4.0	*	1.0	4.0
(CBS 562)									

c = coleção de cultura

* = animais que não morreram em até 60 dias

x = halo em mm

CIM = concentração inibitória mínima

+ = presença

- = ausência

CFM = concentração fungicida mínima

Variáveis estudadas através do teste Mann-Whitney — efeito do sorotipo (A e B) sobre:

- Tempo de isolamento	2 = 0	P = 1
- Superfície da colônia	2 = 0,73	P = 0,69
- Formação de clamidoconídios	2 = 0,39	P = 0,69
- Produção de proteinases	2 = 0,49	P = 0,62
- Produção de fosfolipases	2 = 0,31	P = 0,74
- Sensibilidade a anfotericina B.	2 = 0,33	P = 0,02
- Mortalidade dos animais	2 = 0,12	P = 0,89

Variáveis estudadas através do teste de "Kendall Rank Correlation" — correlação entre mortalidades dos animais e produção de exoenzimas:

- Mortalidade x Proteinases	T = 0,11	P = 0,23
- Mortalidade x Fosfolipases	T = 0,06	P = 0,61

Correlação entre a produção de exoenzimas:

- Proteinases e Fosfolipases	T = 0,34	P = 0,02
------------------------------	----------	----------

De todos os testes realizados (sorotipos, tempo de isolamento das amostras, superfície da colônia, clamidoconídios, fatores de virulência "in vivo" e "in vitro" e sensibilidade a antifúngicos os dados que apresentaram resultados estatisticamente significantes, ao nível de 5%, foram: produção de proteinases em relação ao tempo de isolamento (amostras mantidas em coleções de culturas produziram halos maiores que amostras recém-isoladas); correlação positiva entre produção de proteinases e de fosfolipases (medida do halo em mm) e sensibilidade a anfotericina B. Com relação aos sorotipos e as características estudadas, não houve resultados estatisticamente significantes.

DISCUSSÃO

Características morfológicas — As características mencionadas por Lodder (1970) e Kreger-van Rij (1984), com relação aos aspectos macroscópicos das amostras, quando cultivadas em meios sólidos e líquidos, foram similares às destes estudo, exceção feita à presença de película.

Esteves et alii (1977), consideraram que as variações morfológicas estão relacionadas a mutação e/ou dimorfismo, sem que sua base genética esteja elucidada. Não existe fato concreto que explique estas e outras variações. Quanto às características relacionadas ao crescimento de *C. albicans*, em meios líquidos, estas têm sido associadas ao seu metabolismo facultativo (fermentativo e oxidativo). Quando cultivadas nestes meios passam a formar desde sedimento, resíduo e, em alguns casos, película.

No que diz respeito à forma, tamanho e tipo de reprodução, todas as amostras apresentaram padrão uniforme, concordando com os achados de Lodder (1970) e Kreger-van Rij (1984).

As amostras estudadas, quando cultivadas em meio de cultura pobre em nutrientes e tendo o amido como fonte de carbono, apresentaram alguma diversidade em sua morfologia, no que concerne a presença de micélio verdadeiro, de clamidoconídios-pseudomicélio. Com relação aos agrupamentos dos blastoconídios nas pseudohifas, estes podem ter forma regular ou irregular. Neste estudo, 53,3% das amostras, apresentaram arranjo tipo micotorula, concordando também com a literatura, que cita este agrupamento como o mais frequente. Em pesquisa de tubo germinativo, os resultados também foram concordantes, (8, 9, 14, 16).

Características fisiológicas — Todas as amostras apresentaram padrão uniforme de fermentação, assimilação de fontes de carbono e nitrogênio. Através deste perfil bioquímico, assimilativo e fermentativo, pode-se classificar as mesmas como sendo *C. albicans*, dentro do grupo VII deste gênero. Pois, estes mesmo autor na descrição específica considera a fermentação da sacarose variável Kreger-van Rij, (1984).

Nas provas complementares, a maioria dos resultados obtidos foram uniformes, com exceção da prova de redução do 2-3-5-trifeniltetrazólio (T.T.C.).

O meio básico de Pagano-Levine contém cloreto de 2-3-5-trifeniltetrazólio e antibióticos, quando é feito o isolamento primário. Este teste é utilizado para diferenciar gêneros de leveduras e algumas espécies do gênero *Candida*, através da tonalidade que as colônias adquirem à medida que reduzem o T.T.C. A literatura cita que *C. albicans* quando cultivada à 25°C, por 24-48 horas, adquire tonalidade creme e/ou rosa-claro (7). Foi verificado, entretanto, que esta prova não forneceu resultados homogêneos com todas as amostras estudadas. A maior dificuldade encontrada nas leituras diárias, foi a instabilidade das cores formadas: com 24 horas as amostras já formavam colônias que haviam desenvolvido tonalidade rosa-claro, passavam a ter nos bordos uma outra tonalidade, rosa-escuro, ou então ocorria o contrário, passavam a ter no centro da colônia um tom rosa-escuro e nos bordos rosa-claro. Na última monografia de "The Yeasts. A taxonomy study", Kreger-van Rij (1984), pode-se verificar que a redução do T.T.C. está citada como uma prova fisiológica, porém, sendo mais um teste para caracterizar *C. tropicalis*. Chama-se a atenção para o fato de que, nesta pesquisa, uma

amostra de *C.albicans* reduziu fortemente esta substância.

Produção de Proteinases e Fosfolipases — Pesquisas mais recentes têm relacionado o grau de virulência de *C.albicans*, com a produção de exoenzimas, como proteinases e fosfolipases. A frequência destas enzimas em amostras de leveduras isoladas de material clínico, varia de 100% a 62,5% para proteinases, e ao redor de 50% para fosfolipases. Ao que tudo indica, estas leveduras, quando aderidas às células do hospedeiro, excretam estas enzimas, facilitando assim o poder invasor e interferindo no metabolismo celular do hospedeiro. Esta interferência se deve à alterações no transporte de íons pela célula e/ou na permeabilidade seletiva da mesma, levando ou não a célula do hospedeiro à morte (9,16,18,22).

Com relação às proteinases verificou-se que a maioria das amostras estudadas foi produtora (63,3%) e 92% das reações foram evidenciadas em 24 horas. Estes achados são similares aos encontrados por outros autores (19,22). Salienta-se ainda, que não houve relação significante entre estas exoenzimas e os sorotipos A e B, porém a correlação foi positiva entre a produção de proteinases e fosfolipases nas amostras estudadas.

Inoculações experimentais em coelhos — Vários autores têm assinalado que variações morfológicas, produção de enzimas e toxinas são fatores relacionados a virulência de *C.albicans* (9,10,16).

No presente estudo trabalhou-se verificando a viabilidade das suspensões de células a serem inoculadas, a constatou-se que de 30 coelhos inoculados, 19 (63,3%) chegaram ao óbito, num período de até 20 dias. Desses, 73,3% morreram em até 7 dias. Estes dados discordam, em parte, do trabalho de MacDonald & Odds (1988) que demonstrou a morte da totalidade dos animais inoculados em até 7 dias. Outros autores citam que *C.albicans*, quando inoculada, por via endovenosa, produz a morte dos animais em tempo variável, dependendo da concentração do inóculo, sensibilidade de raça e do grau de virulência da amostra de levedura (8,23).

Relação entre sorotipos, produção de e-xoenzimas e morte de animais inoculados — Dos animais inoculados, (36,6%) não chegaram ao óbito em até 60 dias. Com relação às 5 amostras inoculadas e que levaram os animais ao óbito (63,4%), em até 20 dias, 47,3% eram sorotipo A e 52,6% eram sorotipo B.

Os resultados demonstraram que não houve

uma relação direta entre a produção de exoenzimas, sorotipos e a morte dos animais inoculados, nas condições estudadas.

Sensibilidade à drogas antifúngicas — Existem poucos relatos acerca da sensibilidade dos sorotipos A e B de *C.albicans* a agentes antifúngicos. Entre estes agentes, o cetoconazol tem sido o mais estudado, notadamente quanto a ação inibitória.

No presente trabalho, foram incluídos a Anfotericina B, o cetoconazol e o miconazol, estudando-se tanto a atividade fungistática quanto a fungicida dos mesmos. Os três agentes são de interesse para tratamento de micoses sistêmicas e o conhecimento prévio de sua concentração antifúngica é recomendável, uma vez que varia amplamente com a amostra isolada (1).

Considerando-se os diferentes sorotipos estudados, verificou-se que todas as amostras foram inibidas pela anfotericina B na concentração de 2 µg/ml, passível de ser obtida em níveis séricos (12). Entretanto, as amostras do sorotipo B foram mais sensíveis que as do A frente a menores concentrações desse antibiótico. Esta maior sensibilidade das amostras do sorotipo B também foi observada em relação à atividade fungicida da droga, embora cada sorotípo tenha apresentado maior número de amostras resistentes a concentrações >2 µg/ml. A observação dessa resistência nos diferentes sorotipos é concordante com achados obtidos em estudo anterior, onde, ao contrário do presente trabalho, as amostras do sorotipo B foram menos sensíveis à ação letal da droga em concentrações <2 µg/ml (6).

Frente ao cetoconazol e ao miconazol, as leveduras de ambos os sorotipos foram resistentes a concentrações equivalentes às obtidas no soro (12). Em concentrações superiores, uma pequena percentagem de amostras do sorotipo B mostrou-se mais sensível que as do A à ação inibitória desses imidazólicos. Tais observações são concordantes com as de outros autores que estudaram o comportamento dos diferentes sorotipos frente ao cetoconazol (2,20).

SUMMARY

Morphology, physiology, virulence factors and susceptibility to antifungal drugs of *Candida albicans* isolated in São Paulo, Brazil.

Thirty samples of *C.albicans*, 15 serotype A and 15 serotype B, isolated from clinical materials, (São Paulo, Brazil), were studied for macroscopic and microscopic morphology, physiology, "in vi-

"tro" virulence factors (proteinases and phospholipases production), "in vivo" virulence (experimental venous inoculation in rabbits) and susceptibility to the antifungal drugs (Amphotericin B, Miconazole and Ketoconazole). The production of proteinases showed statistically significant difference in relation to time from collection: samples from collection cultures have produced bigger halo than the recent isolated samples. There was a correlation between the production of proteinases and the production of phospholipases, and susceptibility to the antifungal drug.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves, S. H - Sensibilidade de *Candida*, isoladas de pacientes com câncer, a antifúngicos poliênicos e imidazólicos, 1990. [Dissertação de Mestrado — Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo].
2. Auger, P.; Peloguim, S.; Joly, J.; MontPlaisir, S.; Marquis, G. - Relationship between serotype, sensitivity to cetoconazole and inhibition of pseudomycelial growth in *Candida albicans*. *Mykosen*, 27: 500-5, 1984.
3. Bonifácio-Souza, E. M. - *Candida albicans* (Robin Berkhourt 1923): Sorotipagem e estudo de alguns aspectos morfo-fisiológicos de amostras isoladas de diversos materiais clínicos. 1988- [Dissertação de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo].
4. Corrêa, B.; Purchio, A.; Paula, C. R.; Gambale, W. - Avaliação da eficácia do método fluorescência no estudo de viabilidade de amostras de *Candida albicans*. *Rev. Microbiol.*, 18:258-63, 1987.
5. Cury, A. E. - Atividade "in vitro" de alguns antisépticos sobre —*Candida*. *Rev. Microbiol.*, 17:137-42, 1986.
6. Cury, A. E.; Bonnifácio Souza, E. M.; Corrêa, B.; Gambale, W. - Sensibilidade de sorotipos A e B de *Candida albicans* a antifúngicos. *Rev. Microbiol.* 20, suplemento 1, 1989.
7. Difco Laboratories. *Manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures*. 9ª ed. Detroit, 1972, p. 239.
8. Esteves, J. A.; Cabrita, J. D.; Nobris, G. N.; - *Micrologia Médica*. Lisboa. Fundação Caloustre Gulbenkian, 1977. p. 785.
9. Hurley, R. - The pathogenic *Candida* species and diseases caused by candidas in man. In: Skinner, F. A.; Passmore, S. M.; Davenport, R. R. - *Biology and activities of yeasts*. London. Academic Press, 1980. p. 231-8.
10. Iwata, K. - Fungal toxins and their role in the etiopathology of fungal infections. In: *Recent advances in medical and veterinary mycology*. Ed. K. Iwata. Tokyo, Univ. Park Press, 1975. p. 15-33.
11. Kreger-van Rij, N. J. W. - *The Yeasts: a taxonomic study*. Amsterdam, Elsevier, 1984, p. 1082.
12. Lennette, E. H.; Balows, A.; Hauser Jr., W. Y.; Shadomy, A. Y. - Manual of clinical microbiology. 4 ed., Washington. Am. soc. *Microbiol.*, 1985. p. 1149.
13. Lodder, J. - *The Yeast: a taxonomic study*. 2 ed. Amsterdam, Elsevier North Holland, 1970. p. 135.
14. McGinnis, M.R. - *Laboratory handbook of medical mycology*. New York, Academic Press, 1980. p.661
15. MacDonald, F. & Odds, F. C. - Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *J. Med. Microbiol.*, 13:423-35, 1980.
16. Odds, F. C. - *Candida and Candidosis*. Baltimore, Leicester, 2 ed. Univ. Press, 1988.
17. Paula, C. R.; Purchio, A.; Gambale, W. - Yeasts from beaches in the Southern Area of São Paulo State "Baixada Santista", Brasil. *Rev. Microbiol.*, 14:136-3, 1983.
18. Price, F. M. & Canson, R. A. - Phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20:7-14, 1977.
19. Price, F. M. & Wilkinson, D. L; Gentry, L. O. - Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 7-14, 1982.
20. Ricci, T.A.; Moraes, R.; De Lemos, E.A.; Maro, M.; Melhem, M. S. C.; Mendes-Giannini, M. J. S. - *Candida albicans* isoladas de pacientes aidéticos: sorotipagem, biotipagem e suscetibilidade a antibióticos e quimioterápicos. *Rev. Microbiol.* 20, suplemento 1, 1989.
21. Rippon, J. W. - *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia, Saunders, 1974. 587p.
22. Ruchell, R.; Tegeler, R.; Trost, M. - A comparison of secretory proteinases from different strains of *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 20: 233-44, 1982.
23. Winner, H. S.; Hurley, R. - *Candida albicans*. London. Churchill, 1964. 320 p.

Recebido para publicação em 25/10/89

LEVEDURAS ASSOCIADAS À PORÇÃO TERMINAL DO INTESTINO GROSSO DE *RANA CATESBEIANA*, SHAW (1802), EM DIFERENTES FASES DE CRESCIMENTO

José Horácio Reis*
Yassca Kassai Moreira**
Marly Geralda Alves Nogueira***
Élvio Carlos Moreira****

RESUMO

Foram estudadas as porções terminais do intestino grosso de 64 rãs da espécie *Rana catesbeiana* criadas em confinamento. Esses animais foram separados em quatro fases distintas de crescimento, tendo sido alimentados com três tipos de ração. Foram isoladas 129, estirpes de leveduras identificadas através de métodos baseados em características macroscópicas, microscópicas e fisiológicas, totalizando 35 estirpes identificadas em 24 espécies. Dentre as leveduras encontradas destacam-se as do gênero *Candida* pela freqüência de isolamento sendo a espécie *Candida rugosa* a mais freqüentemente isolada nas quatro fases de crescimento, sugerindo tratar-se de levedura autóctone do trato alimentar destes animais. Ressalta-se a ocorrência de leveduras potencialmente patogênicas para o homem, bem como a importância da transição do ambiente estritamente aquático para o terrestre, como provável fator de significado ecológico, responsável pela composição da qualidade da microbiota leveduriforme do trato alimentar destes animais.

Palavras chaves: *Rana catesbeiana*, rã, leveduras do intestino grosso.

INTRODUÇÃO

A *Rana catesbeiana*, conhecida comumente como Rã-Touro (Bull-frog), é originária da América do Norte e seu nome se deve ao fato de o coaxar dos machos ser semelhante ao mugido do touro. Segundo Vizotto (41,42), a rã-touro foi introduzida no Brasil em 1935 e a partir de 1969 foi iniciada sua criação intensiva. O autor considera que a rã-

touro oferece algumas vantagens sobre as rãs brasileiras, dada a precocidade reprodutiva, maior quantidade de óvulos e ganho de peso em pouco tempo.

Para Azevedo (4), atualmente uma das grandes limitações da ranicultura brasileira é inerente à alimentação ideal destes animais, apesar da realização de inúmeras pesquisas voltadas para este fim.

No momento, existe outro tipo de preocu-

* Ecologia e Técnicas de Biotério/PUC/MG.

** Departamento de Microbiologia/ICB/UFGM.

*** Departamento de Análises Clínicas./EFUFOP

**** Departamento de Medicina Veterinária Preventiva/EVUFMG.

Correspondência para: Laboratório de Microbiologia — ICB/UFGM
Caixa Postal, 2486
30 161 - Belo Horizonte - MG.

pação por parte dos ranicultores, relacionada com a sanidade das rãs e com as condições higiênico-sanitárias dos abatedouros. Por ocasião do VI Encontro Nacional de Ranicultura, realizado no Rio de Janeiro (12), dois fatores foram destacados: a necessidade de pesquisas sobre a ocorrência de doenças e estudo de rígido controle de limpeza dos locais de criação e abatedouros, para obtenção de produtos dentro das normas e padrões internacionais de qualidade (40).

É evidente o interesse de vários autores em conhecer a importância da microbiota bacteriana nestes animais. Trabalhos relacionados com o assunto têm mostrado alguns estudos em rãs e outros anfíbios, com sinais clínicos de doença, a partir dos quais foram isoladas algumas bactérias (15, 22, 44, 20). Outros autores têm realizado pesquisas no sentido de conhecer a flora bacteriana normal de diferentes tipos de rãs, (3, 14, 17, 18 e 39).

No entanto, com referência aos fungos, a literatura nacional e estrangeira é escassa. Algumas pesquisas já foram realizadas em rãs e outros anfíbios, tendo sido isolados e identificados alguns fungos potencialmente patogênicos para o animal em estudo e o homem (6, 19, 28, 30 e 31). Por outro lado, alguns estudos têm revelado a importância da alimentação na determinação do tipo da flora microbiana do trato alimentar de *R. catesbeiana* (39), assim como o papel da levedura patogênica *Candida humicola* na determinação do melhor crescimento de girinos de *R. catesbeiana* (37, 38).

O conhecimento da microbiota fúngica intestinal da *R. catesbeiana* é relevante, devido no momento, existir grande interesse como espécie de exploração econômica. Este aspecto ressalta a necessidade de vários estudos relacionados a biologia e manejo destes anfíbios, e, em especial, ao papel que os microrganismos, mormente as leveduras desempenham na exploração racional da ranicultura.

O presente trabalho teve como objetivos, conhecer as leveduras associadas ao trato intestinal de *R. catesbeiana* em diferentes fases de crescimento e verificar se algumas delas são potencialmente patogênicas para o homem.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho constou do estudo de fragmentos da porção terminal do intestino grosso de 64 rãs da espécie *R. catesbeiana*. Os animais foram criados no Laboratório Experimental de Ranicultura da Pon-

tifícia Universidade Católica de Minas Gerais e sacrificados no laboratório de Microbiologia da referida Universidade. A fase de isolamento e identificação das leveduras foi executada no laboratório de Micologia do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Área de girinos

Foi utilizado um tanque em alvenaria com fundo de terra batida, de 7 m de comprimento, 1 m de largura e 40 cm de profundidade. Este tanque, com paredes laterais inclinadas, permitia a saída dos animais metamorfoseados para outro tipo de tanque que apresentava 3 m de comprimento, 1 m de largura e 5 cm de profundidade facilitando a coleta dos animais (transição-água-terra).

Área de engorda

Foi utilizada uma área de 2 m de comprimento, 1 m de largura e 80 cm de altura, que apresentava 30% de área aquática e 70% de área terrestre, toda ela construída em alvenaria.

Amostras

Foram utilizados como amostras:

- 16 girinos no estágio de desenvolvimento nº 41, Gosner (16), escolhidos aleatoriamente; apresentavam peso vivo entre 20,6 e 24,6 g, e idade de sete meses (1ª fase de crescimento);

- 16 rãs pós-metamorfoseadas (imagos) no estágio de desenvolvimento nº 46, segundo Gosner (16), também escolhidos aleatoriamente. Estes animais apresentavam peso vivo entre 17,4 e 19,8 g e oito dias de vida pós-metamorfose (2ª fase de crescimento);

- 16 rãs jovens, com peso vivo entre 70 e 94,0 g, com 60 dias de engorda (3ª fase de crescimento);

- 16 rãs jovens com peso vivo entre 137 e 169 g, com 120 dias de engorda (4ª fase de crescimento), escolhidas aleatoriamente.

Análise estatística

A determinação da amostra experimental foi calculada de acordo com Cochram (7) e o tratamento analítico dos resultados constou da determinação da freqüência relativa, em termos de percentagem das leveduras identificadas, sobre o total de rãs estudadas.

Manejo animal e alimentar

Para estudo, foram recolhidos 16 girinos juntamente com 100 imágens. Destes últimos, separaram-se aleatoriamente, 16 animais, que foram utilizados como amostras, e os restantes levados ao setor de engorda. Decorridos dois e quatro meses de engorda, recolheram-se de modo aleatório, 16 indivíduos na terceira e quarta fases de crescimento, respectivamente, para posterior estudo.

Foram fornecidos nas quatro fases de crescimento dos animais três tipos de ração: A ração tipo I era constituída de 50% de farelo de soja, 30% de farinha de carne e osso, 10% de ração de suínos para crescimento, 5% de farelo de trigo e 5% de farelo de milho. A ração tipo II era constituída de 35% de farinha de carne e osso, 50% de ração para engorda de frangos e 15% de farelo de trigo. Os constituintes eram misturados na proporção de 1 kg de mistura para 1/2 kg de baço de boi moído.

Os animais pós-metamorfoseados que foram levados à engorda receberam esta ração acrescida ainda de 25% de larvas de mosca (*Musca doméstica*) e minhocas (*Eisenia foetida*). Diariamente a ração era fornecida aos anfíbios na proporção de 5% do peso vivo dos animais. Aqui deve-se ressaltar que 16 animais pós-metamorfoseados (2ª fase) não chegaram a receber qualquer tipo de alimento. A ração tipo III era constituída dos mesmos ingredientes da ração tipo II, porém destituída de minhocas e reduzida em 50% de larvas de moscas.

Abate do animal e acondicionamento do fragmento do intestino

Os animais utilizados foram sacrificados em câmara com éter. Em seguida, recolheu-se aproximadamente 1 cm da porção final do intestino grosso que foi acondicionado em solução fisiológica esterilizada. A utilização da porção final se justifica por conter microrganismos de todos os segmentos do tubo digestivo.

Técnica de isolamento de leveduras

Os tubos com fragmentos do intestino dos animais foram processados como se segue: após agitação em Vortex, 1,0 ml das suspensões foi semeado em placas com Agar Sabouraud - dextrose e Agar Malte, ambos contendo cloranfenicol. O isolamento das leveduras foi feito, inicialmente, em tubos com Agar-Malte, à temperatura ambiente. Após 48 horas, foi feita uma suspensão da cultura em 10 ml de água destilada estéril e semeada por esgotamento em pla-

cas com Agar-Sabouraud dextrose acrescido de penicilina e estreptomicina, de modo a obter colônias isoladas. Estas foram mantidas em tubos de Agar-Sabouraud-dextrose, para posterior identificação.

Identificação das leveduras

O estudo taxonômico das leveduras foi realizado utilizando-se métodos recomendados por Kreger Van Rij (26).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados contidos na Tabela 1 e 2 relacionam as quatro fases de crescimento, com a freqüência de isolamentos de leveduras em cada uma. Foram isoladas 129 estirpes de leveduras, identificadas em 24 espécies; 11 espécies foram classificadas como spp. Estas estirpes foram classificadas neste gênero, devido a formação de pseudomicelio com assimilação ou não de inositol. Todas elas fermentaram açúcares, sendo a glicose usada por todas. Quanto à prova de D.B.B., foram negativas, sugerindo não apresentarem características de leveduras com tendência basidiomicetica (21).

Tabela 1 — Frequência relativa de leveduras isoladas da porção final do intestino grosso de *Rana catesbeiana*, de acordo com as quatro fases de crescimento.

Fases	Número de animais	Número de isolamentos	Percentual
1 ^a	16	26	20,2
2 ^a	16	23	17,8
3 ^a	16	30	29,4
4 ^a	16	42	32,6
Total	64	129	100

Procurando observar as características morfológicas e fisiológicas, onze estirpes não corresponderam às apontadas, razão esta de terem sido agrupadas como spp. Estas características podem estar associadas à condição de laboratório, onde o uso de determinados meios, a exemplo do Agar Malte, pode ter levado a instabilidade fisiológica (26).

Estão relacionadas abaixo as características diferenciais das onze estirpes de *Candida* estudadas, mostrando a impossibilidade de enquadrá-las nas respectivas espécies. A identificação de espécies, bem como o esclarecimento de tais características, implica na realização de testes mais precisos, como o estudo de genoma.

Candida sp1 — Esta estirpe, quanto a características fisiológicas, está mais relacionada com a *Candida terebra*, diferindo contudo por não fermentar galactose. Quanto à assimilação difere por assimilar melibiose, e não assimilar L-arabinose, melizitose e sacarose. A morfologia do pseudomicélio é diferente da que é descrita para *C. terebra*.

Candida sp2 — Esta levedura, quanto a características fisiológicas está relacionada com a *Candida azyma*, diferindo no entanto por não assimilar L-sorbose, sacarose, trealose, melizitose. Quanto a morfologia difere por não apresentar anel em caldo extrato de malte.

Candida sp3 — Estirpe relacionada com a *Candida kefyr*, difere no entanto por não assimilar sacarose e rafinose. A morfologia do pseudomicélio apresenta diferenças.

Candida sp4 — Esta levedura, quanto a características fisiológicas está relacionada com a *Candida naeodendra*, diferindo no entanto por assimilar lactose, Melibiose e não assimilar maltose, melizitose, e ácido cítrico.

Candida sp5 — Esta estirpe está relacionada com a *Candida vanderwaltii* diferindo no entanto por não assimilar trealose, L. arabinose, D-ribose e assimilar L-Rhamnose, celobiose e maltose. Quanto a morfologia não foi observada a presença de ilhotas em caldo extrato de Malte, constituindo mais uma diferença.

Candida sp6 — Levedura, que, quanto, a características fisiológicas, está relacionada com a *Candida entomaea* diferindo no entanto por não assimilar sacarose, celobiose, trealose, xilose, D-ribose, ribitol e crescer no meio livre de vitaminas.

Candida sp7 — Esta estirpe de levedura, quanto à características fisiológicas, está relacionada com a *Candida xestobii*, diferindo no entanto por não assimilar L-sorbose, sacarose, melibiose e crescer em meio livre de vitaminas.

Candida sp8 — Levedura relacionada com a *Candida nitratophila*, diferindo no entanto por não assimilar galactose, xilose, arabinose, ribitol e assimilar L-sorbose e ácido cítrico. Esta estirpe cresce bem em meio livre de vitaminas, constituindo mais uma diferença.

Candida sp9 — Estirpe relacionada com a *Candida berthetii* difere no entanto por assimilar: sacarose, L-rhamnose, ribitol, sorbitol, manitol, xilose e melibiose. Ainda é incapaz de crescer a 37°C e não crescer em meio livre de vitaminas.

Candida sp10 — Esta levedura, quanto a característica fisiológica, está relacionada com a *Candida lusitaniae (clavispora lusitaniae)*, diferindo no entanto por não assimilar ribitol, maltose, sacarose e

assimilar rafinose. Não foi observada a presença de ascospores, constituindo mais uma diferença.

Candida sp11 — Estirpe relacionada com a *Candida boidinii*, diferindo no entanto por não assimilar galactose e D-ribose e assimilar melizitose, L-rhamnose e ácido succínico.

Na revisão da literatura sobre este assunto não se encontrou registros deste tipo de estudo. Tal fato sugere que a presente pesquisa seja a primeira sobre o tema cujo resultado está de acordo com o de Moreira et alii (29), onde os autores estudaram a respectiva microbiota em animais com peso para abate.

Sugita et alii (39), estudaram a microbiota intestinal de *R. catesbeiana* em diferentes estágios de crescimento, mostrando ser muito semelhantes à microbiota de peixes. Estes autores relatam ainda a presença de leveduras em larvas de *Tenébrio* sp., utilizadas na alimentação destas rãs.

Smith (39) faz algumas observações sobre a microbiota do trato alimentar de diferentes espécies animais e fatores que afetam sua composição. Estes fatores incluem dieta, estrutura e função gástrica, hábito alimentar, coprofagia e espécie animal. Neste relato foram utilizados vários animais de laboratório entre eles a *Rana temporária*, sendo isoladas leveduras do estômago e de fragmento do intestino, apesar de não tê-las identificado.

Barros Neto (5), utilizando 354 rãs de ambos os sexos da espécie *R. catesbeiana*, em diferentes estágios de crescimento e criadas de maneira idêntica a do presente trabalho, verificou que a secreção de H+, induzida com histamina, é maior em animais com até 40 g de peso que em animais adultos (80 a 150g). Esta informação, comparada com a de Smith (36) que relata a importância da função gástrica na composição da microbiota intestinal, indica a possibilidade deste fator também estar contribuindo para a composição da microbiota em estudo.

Na Tabela 2 encontram-se relacionadas as estirpes de leveduras de acordo com as fases de crescimento. Na primeira fase de crescimento dos animais (girinos), observa-se uma alta freqüência de leveduras do gênero *Candida* ocorrendo no intestino dos 16 animais, parecendo constituir um habitat ideal à sobrevivência de leveduras deste gênero. Destaca-se a espécie *C. rugosa* pela alta freqüência de isolamentos nesta fase.

C. rugosa já foi isolada do trato intestinal de humanos (1), e de sucos de frutas (9), sendo atualmente usada em biotecnologia para hidrolisar óleos e gorduras (24, 43). Estes resultados obtidos indicam uma possível contaminação fecal da água

Tabela 2 — Distribuição de espécies de leveduras isoladas da porção final do intestino grosso de 64 animais (*Rana catesbeiana*), nas quatro fases de crescimento dos animais.

Nº Espécies de leveduras	Nº de isolamentos Fases de crescimento				Frequência absoluta	%	Nº animais positivo	%
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a				
01 <i>Candida bombicola</i>			1		1	0,8	1	1,6
02 <i>Candida catenulata</i>		5	7	12	9,4	12	18,0	
03 <i>Candida citrea</i>			1	1	0,8	1	1,6	
04 <i>Candida holmii</i>		2		2	1,6	2	3,2	
05 <i>Candida insectalens</i>			1	1	0,8	1	1,6	
06 <i>Candida insectamans</i>		1		1	0,8	1	1,6	
07 <i>Candida ingens</i>			1	1	0,8	1	1,6	
08 <i>Candida kruissi</i>			1	1	0,8	1	1,6	
09 <i>Candida krusei</i>			7	7	5,6	5	8,0	
10 <i>Candida musciliagina</i>			1	1	0,8	1	1,6	
11 <i>Candida nemodendra</i>		1		1	0,8	1	1,6	
12 <i>Candida pararugosa</i>			1	1	0,8	1	1,6	
13 <i>Candida rugosa</i>	16	6	5	8	35	27,1	28	44,8
14 <i>Candida tropicalis</i>			2	1	3	2,4	3	4,8
15 <i>Candida vanderwaltii</i>			1		1	0,8	1	1,6
16 <i>Candida</i> sp. 1		1			1	0,8	1	1,6
17 <i>Candida</i> sp. 2		1			1	0,8	1	1,6
18 <i>Candida</i> sp. 3		1			1	0,8	1	1,6
19 <i>Candida</i> sp. 4		1			1	0,8	1	1,6
20 <i>Candida</i> sp. 5			1		1	0,8	1	1,6
21 <i>Candida</i> sp. 6		1	2		3	2,4	3	4,8
22 <i>Candida</i> sp. 7			2		2	1,6	2	3,2
23 <i>Candida</i> sp. 8				1	1	0,8	1	1,6
24 <i>Candida</i> sp. 9				1	1	0,8	1	1,6
25 <i>Candida</i> sp. 10				3	3	2,4	2	3,2
26 <i>Candida</i> sp. 11				1	1	0,8	1	1,6
27 <i>Cryptococcus luteolus</i>				1	1	0,8	1	1,6
28 <i>Geotrichum capitatum</i>		12	1		13	10,2	9	14,4
29 <i>Rhodotorula graminis</i>	1				1	0,8	1	1,6
30 <i>Rhodotorula minuta</i>	1	1			2	1,6	2	3,2
31 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2		5	1	8	6,4	8	12,8
32 <i>Trichosporon aquatile</i>			1		1	0,8	1	1,6
33 <i>Trichosporon cutaneum</i>	1		7	3	11	8,5	10	16,0
34 <i>Trichosporon figueirae</i>				1	1	0,8	1	1,6
35 <i>Trichosporon pullulans</i>	1	1	3	1	6	4,8	5	8,0
Total	26	23	38	42	129	100,0		

ou do alimento consumido, além de sugerir um papel desempenhado por esta levedura no intestino desses animais.

Estudos posteriores, baseados em dietas quimicamente definidas e em animais livres de gérmenes, poderiam vir a esclarecer o papel destas leveduras, bem como a natureza das interações entre estes fungos no trato alimentar de rãs.

Destaca-se a importância de leveduras do gênero *Candida* pela presença de várias espécies importantes serem responsáveis por patologias no homem e animais (25, 27).

Ainda na primeira fase de crescimento dos animais, verifica-se a presença de outras leveduras como: *Rhodotorula graminis*, *R. minuta*, e *Saccharomyces cerevisiae*. Estes achados sugerem a presença destas leveduras no alimento e/ou água usada

no abastecimento dos tanques. Destaca-se a importância do *S. cerevisiae* por se tratar de levedura que já foi encontrada em lesões ulcerativas na coxa de humanos (26).

O gênero *Trichosporon* está representando pelas espécies *T. cutaneum* e *T. pullulans*. Estes achados estão de acordo com os de Mok & Morato (28), onde os autores isolaram *T. cutaneum* em órgãos internos de anfíbios clinicamente sadios, na Amazônia. Outros autores isolaram o *T. cutaneum* de fases de ratos, ceco de porco, rumem de vaca, ceco de perus, cultura de tecido de anfíbios, solo, água doce, esgoto e polpa de madeira (26). *T. cutaneum* também é uma levedura de interesse médico por se tratar de microrganismo oportunista e responsável por enfermidades no homem e animais (8, 27, 2). *T. pullulans* já foi isolado de sciva

de plantas, polpa de madeira, solo, manteiga, e carne congelada, além de hidrolizar óleos e gorduras (26). Estes achados parecem indicar a presença destas leveduras no alimento e/ou na água.

Entre as 23 estirpes de leveduras isoladas na segunda fase de crescimento (imagos) verifica-se o aparecimento de leveduras pertencentes à espécie *Geotrichum capitatum* em substituição à espécie *S. cerevisiae*. Estes achados poderiam estar relacionados com a ausência de alimento. O *G. capitatum* foi isolado de 50% dos animais nesta fase, não tendo sido isolado na primeira. Os animais da primeira fase de crescimento tem dependência exclusiva da água, estando sua microbiota intestinal mais relacionada a este ambiente somada àquela provavelmente presente no alimento consumido pelos animais.

Na segunda fase os animais não se encontram mais estritamente ligados a este "habitat", entrando em contato com microrganismos de outro ambiente. Aqui os animais que saíram da água foram coletados em tanques intermediários mais rasos, usados para facilitar sua captura antes de serem utilizados (transição Água-Terra). Atenção deve ser dada ao fato destes animais estarem expostos a microrganismos de outro ambiente, podendo ser colonizados por outros microrganismos. Este fato poderá vir a contribuir, inclusive com o aparecimento de doenças.

A literatura relata caso de epidemia em rãs criadas em confinamento causado pelo fungo *Cladosporium* sp. (30). Estas informações sugerem necessidade de métodos criteriosos no sentido de se adequarem melhor as instalações, o manejo e as condições higiênico - sanitárias para criação dos animais.

Ainda na segunda fase de crescimento dos animais verifica-se que o gênero *Candida* está representado por duas espécies e duas estirpes não identificadas em que a *C. rugosa* persiste.

Com relação à presença das outras espécies de leveduras, observa-se o isolamento de algumas espécies diferentes a cada fase de crescimento, bem como o desaparecimento de outras. Este fato sugere tratar-se de leveduras transitórias no trato alimentar desses animais. Segundo Savage (34), na flora do tubo digestivo de todo animal vivo é possível encontrar numerosos microrganismos provenientes do ambiente, em particular através da alimentação e que transitam passivamente sem encontrar nicho ecológico conveniente para seu desenvolvimento. Estes são microrganismos alóctones.

Na terceira fase de crescimento, verifica-se que as leveduras do gênero *Candida* seguidas das dos

gêneros *Trichosporon* e *Saccharomyces* mostraram ser as mais freqüentemente isoladas. A diversidade de espécies de leveduras encontradas na referida fase parece confirmar a provável presença das mesmas no alimento fornecido. A *C. rugosa* continua presente nesta fase.

O *T. cutaneum* e *S. cerevistae* foram novamente isolados nesta fase de crescimento; portanto estes isolamentos parecem confirmar a provável relação com a presença do alimento.

Na quarta e última fase de crescimento dos animais, observa-se a presença de leveduras do gênero *Candida* representado por 10 espécies, em que a *C. rugosa* e *C. catenulata* foram as mais isoladas além das 4 estirpes de *Candida* não identificadas. Comparando estes resultados com os das fases anteriores, observa-se que a *C. catenulata* juntamente com a *C. tropicalis*, foram isoladas na terceira fase de crescimento dos animais e persistiram. Segundo Savage (34), um microrganismo pode colonizar o tubo digestivo de um animal vivo após a idade adulta e persistir. Acredita-se que o alimento também possa estar contribuindo para a manutenção desta microbiota.

A *C. catenulata* é uma levedura que já foi isolada de fezes humanas, ceco de galinhas e água (26). Estes resultados parecem confirmar a provável contaminação fecal do alimento, e/ou água.

O isolamento da *C. tropicalis* está de acordo com Mok & Morato (28), onde os autores isolaram esta levedura do intestino de anuros da Amazônia, mostrando tratar-se de mais uma levedura de interesse médico também encontrada no intestino de anfíbios.

Entre as outras espécies de leveduras isoladas na quarta fase de crescimento destaca-se a presença das espécies *C. krusei*, *C. tropicalis*, *S. cerevisiae*, *T. cutaneum*, por serem consideradas leveduras de interesse médico (23, 33, 27, 13, 25).

Na Tabela 2 encontram-se distribuídas 120 leveduras pertencentes a 24 espécies. Os resultados mostram que as espécies *C. rugosa* e *T. pullulans* foram isoladas durante as quatro fases de crescimento dos animais.

O *T. pullulans* já foi isolado de polpa de madeira, carne congelada e manteiga (26). Esta espécie juntamente com a *C. rugosa* pode ser capaz de sintetizar lipases, participando da hidrólise de óleos e gorduras. Estes dados sugerem uma relação competitiva interespecífica por este nutriente que parece favorecer a manutenção de *C. rugosa*.

Consultando a bibliografia referente à ecologia microbiana do tubo digestivo de outros animais

(Duchezau & Raibaud) (11), verifica-se que Dubos et alii (10), preferem considerar microbiota autóctone ou indígena aquela capaz de se associar ao animal permanentemente após seu nascimento. De acordo com esses autores, as espécies *C. rugosa* e *T. pullulans* poderiam ser assim classificadas. No entanto Savage (34) enumera uma série de condições que devem ser cumpridas para se considerar um microorganismo autóctone e que não foram aqui totalmente observadas. Estas condições incluem: crescer em anaerobiose, estar sempre presente no tubo digestivo de animais adultos considerados normais, colonizar determinados níveis do tubo digestivo, isto é, multiplicar-se e persistir, estabelecer-se no seu nicho ecológico ao longo das etapas habituais de colonização do tubo digestivo no indivíduo jovem, manter-se a um nível estável entre as populações em equilíbrio e poder se associar intimamente à mucosa epitelial ao nível do tubo digestivo colonizado. Além destas, permanece ainda uma certa imprecisão na definição de flora autóctone porque nas condições de laboratório nem sempre as condições "in vivo" são reproduzidas.

De acordo com Savage (34), a espécie *C. rugosa* é a única levedura provavelmente considerada autóctone, dentro das condições metodológicas do presente trabalho.

Os dados de presente trabalho suscitam a necessidade de uma avaliação microbiológica da água, do alimento, além de uma avaliação ecológica com metodologia quantitativa que permita maiores especulações sobre o possível papel que estas leveduras teriam, em termos normais e patológicos, para esses animais e para o homem.

SUMMARY

Yeast associated with the terminal portion or large intestine of *Rana catesbeiana*, Shaw (1802), at different growth stage.

Yeasts associated with the terminal portion of large intestine of 64 frogs (*Rana catesbeiana*) raised confined were studied. The animals were divided in four groups at different growth stage and received different diet. 129 yeasts strains were isolated and identified by macroscopic, microscopic and physiological features in 24 species; 11 strains could be identified at the species level. The genus *Candida* was prevalent in all stages, being *Candida rugosa* the most frequently isolated species, suggesting

this to be an autochthonous yeast from the alimentary tract of these animals, yeasts species potentially pathogenic for man was also found. The transition from aquatic to ground environment can have an ecological meaning influencing the yeast flora composition in the alimentary tract of these animals.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderson, H. W. Yeast-like fungi of the human intestinal tract. *J. Infect. Dis.*, Chicago, 21:341-86, 1917.
- Ando, M. K.; Yoshida, K.; Soda, K.; Sakata, M.; Sigimoto, M.; Araki, S. Summer type hypersensitivity pneumonitis as a Sickhouse Syndrome Human, *Trichosporon cutaneum*, Japan. *Biological Abstracts*, Philadelphia, 35 (2): 120, 1988. (Abstract).
- Andrews, W. H.; Wilson, C. R.; Poelma, P. L.; Romero, A. Comparison of methods for isolation of *Salmonella* from imported frog legs. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 33 (11):65-8, 1977.
- Azevedo, A. G. Situação da ranicultura no Brasil, referente ao período de 1935 a junho de 1988. In: Encontro Nacional de Ranicultura, 6., Rio de Janeiro, 1988. *Programa final*. Rio de Janeiro, Associação dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro, s. d.
- Barros Neto, R. *Estudo da resposta secretora da mucosa gástrica isolada de rã, Rana catesbeiana em diferentes estágios de crescimento*. Belo Horizonte. Instituto de Ciências Biológicas/ UFMG, 1988. 73p. (Tese, mestrado).
- Carine, A. Sur une moisissure qui cause une maladie spontanée de *Leptodactylus pentadactylus*. *An. l'Inst. Pasteur*, 24:43-47, 1910.
- Cohran, W. G. *Técnicas de muestreo*. México 22, Compañía Editorial Continental, 1972. 507p.
- Davis, B. D.; Dulbecco, R.; Eisen, H. N.; Ginsberg, H. S.; Wood Jr., W. B. *Microbiologia - Infecções bacterianas e micóticas*. São Paulo, Edart, 1973. v.3, p. 360-70.
- Dennis, C. & Flouanoy, D. J. Isolation of yeast from frozen fruit juices. *Med. Sci.*, 14 (6): 575-6, 1986.
- Dubos, R.; Shaedler, R. W.; Costello, R.; Hoet, P. Indigenous, normal and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. *J. Exp. Med.*, New York, 122:67-76, 1965.
- Duchezau, R. & Raibaud, P. *Écologie Microbienne du tube digestif*. Ed. Paris, Masson, 1979. 94p.
- Encontro Nacional de Ranicultura, 6, Rio de Janeiro, 1988. *Programa final*. Rio de Janeiro, Associação dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro, s. d.
- Eng, R. H. K.; Drchmer, R.; Smith, S. M.; Goldstein, E. J. C. *Saccharomyces cerevisiae* infections in man. *Sabouraudia*, 22, 403-407, 1984.
- Ferreira, M. D. & Reis, J. H. Pesquisa de enterobacterias em *Rana catesbeiana*. In: Associação Mineira de Aquicultura. *Coletânea de resumos dos encontros da Associação Mineira de Aquicultura (AMA) 1982-1987*. Brasília, CODEVASF, 1988. p. 124.
- Glorioso, J. C.; Amborski, G. F.; Culley, D. D. Microbiological studies of septicemic Bull-frogs (*Rana catesbeiana*). *Am. J. Vet. Res.* Schaumburg, 35 (9): 1241-5, 1974.

16. Gosner, K. L. A simplicied table four staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica*, 16:183-90, 1960.
17. Gossling, J.; Loesche, W. J.; Nace, G. W. Large intestine bacterial flora of nonhibernating and hibernating leopard frogs (*Rana pipens*). *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 44 (1):59-66, 1982a.
18. Gossling, D.; Loesche, W. J.; Nace, G. W. Response of intestinal flora of Laboratory Reared Leopard frogs (*Rana pipens*) to cold and fasting. *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 44 (1):67-71, 1982b.
19. Gugnani, H. C. & Okafor, J. I. Mycotic flora of intestine and other internal organs of certain reptiles and amphibians with special reference to characterization of *Basidiobolus* isolates. *Mykosen*, Berlin, 23 (5):260-8, 1980.
20. Guimarães, N. D.; Silveira, W.; Rodrigues, M. N. Infecção por *Streptococcus* sp. em rã-touro (*Rana catesbeiana*) nos Estados de Goiás e Pará. In: Encontro Nacional de Ranicultura, 6, Rio de Janeiro, 1988. *Programa final*. Rio de Janeiro, Associação dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro, s. d.
21. Hagler, A. M. & Ahearn, D. G. A rapid DBB test to detect basiomycetous affinity of yeasts. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, Washington, 31:204-8, 1981.
22. Hird, D. W.; Diesch, S. L.; McKinnell, R. G.; Gorham, E.; Martins, F. B.; Meadows, C. A.; Gasiorowski, M. Enterobacteriaceae and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipens*). *Appl. Environ. Microbiol.*, Washington, 46 (6):1423-5, 1983.
23. Holzch, D. L.; Chandler, F. W.; Ajello, L. & Ahearn, D. G. Evaluation of industrial yeasts for pathogenicity. *Sabouraudia*, 17; 71-78, 1979.
24. Khor, H. T.; Tan, N. H.; Chua, C. L. Palm oil Splitting by and imobilized lipase. *Candida rugosa* reactors, Biotechnology, fats and oils. *Biological abstracts*, Philadelphia, 34 (1):MT-54, 1988.
25. Klotz, S. A. Endothelial cell contraction results in increased *Candida* yeast adherence *Candida albicans*, *Candida tropicalis*. Bovine Aorta, 1988. *Biological Abstracts*, Philadelphia, 34(9): MG-15, 1988 (Abstract).
26. Kreger-Van Rij, N. J. W. *The yeasts - a taxonomic study*. 3. ed. revise. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1984.
27. Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C. *Micologia médica*. 7. ed. São Paulo, Sarvier, 1984, 479p.
28. Mok W. Y. & Morato, C. C. Association of anurans with pathogenic fungi. *Mycopathologia*, The Hague, 92(1): 37-44, 1985.
29. Moreira, Y. K.; Reis, J. H.; Almeida, A. Pesquisa de leveduras intestinais em *Rana catesbeiana*. In: Encontro Anual de Aquicultura, 5, Belo Horizonte, 1987. *Resumos...* Brasília, CODEVASF, 1988, a, p. 124.
30. Moreira, Y. K.; Reis, J. H.; Rocha, O. A. Surto de cromomicose generalizada em rãs (*Rana catesbeiana*), causado pelo *Cladosporium* sp. M. G. Brasil. In: Encontro Anual de Aquicultura, 6, Belo Horizonte, Associação Mineira de Aquicultura, 1988b. p.15.
31. Porto, E. & Milanez, A. I. Basidiobolus isolados de répteis e anfíbios no Brasil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, São Paulo, 21(5): 237-45, 1979.
32. Reichenbach-Klinke, H. & Elkan, E. *The principal diseases of lower vertebrates*. New York, Academic Press, 1965.
33. Sarfati, C.; Basset, D.; Guilhot, F.; Gluckman, E.; Deverge, A.; Abdelmoula, J. Fatal Trichosporon cutaneum septicemia in an immunodepressed subject. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.*, Paris, 12(1): 39-42, 1983.
34. Savage, D. C. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Ann. Rev. Microbiol.*, Palo Alto, 31: 107-33, 1977.
35. Shaw, G. Bull frog. In: *General Zoology or systematic natural history*. London, G. Kearsley, 1802. part. 1., p. 106-8.
36. Smith, H. W. The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J. Pathol. Bacteriol.*, Edinburg, 90: 495-513, 1965.
37. Steinwascher, K. Competitive interactions among tadpoles: Responses to resource level. *Ecology*, Durham, 60(6): 1172-83, 1979a.
38. Steinwascher, K. Host-Parasite interaction as a potential population - Regulating mechanism. *Ecology Society of America*, Durham, 60(5): 884-90, 1979b.
39. Sugita, H.; Nakajima, T.; Deguchi. The intestinal microflora of bull-frog *Rana catesbeiana* at different stages of its development. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, Tokyo, 51(21): 295-9, 1985.
40. Teixeira, R. D.; Costa Júnior, G. A.; Borges, G. F. Técnicas de abate e industrialização de rãs. In: Encontro Nacional de Ranicultura, 6, Rio de Janeiro, 1988. *Programa final*. Rio de Janeiro, Associação dos Ranicultores do Estado do Rio de Janeiro, s. d.
41. Vizotto, L. D. Biologia e desenvolvimento da rã. In: Encontro Nacional de Ranicultura, 4, Goiânia, 1984. *Anais...* Goiânia, 1984, p. 39-53.
42. Vizotto, L. D. Ranicultura brasileira. *Informativo Associação Nacional de Ranicultura e dos Ranicultores*, São Paulo, (4):1-30, 1986.

Recebido para publicação em 27/11/89

RHODOTORULA RUBRA EM CABELOS HUMANOS SIMULANDO QUADRO DE PIEDRA BRANCA

Maria de Fátima Costa Pires¹

Cezar Mendes de Assis¹

Maria Walderez Szesz¹

Sandra Regina Brasil Stolf Pukinskas¹

Mauro Cintra Giudice¹

Claudete Rodrigues Paula²

& Adhemar Purchio²

RESUMO

Rhodotorula rubra é levedura oportunista, estando associada a uma variedade de processos patológicos no homem, é freqüentemente encontrada como contaminante da pele, pulmão, urina, fezes e sistema nervoso central e com grande significado quando presente no sangue. As dermatites humanas causadas por *Rhodotorula* têm sido relatadas mas não documentadas. O presente trabalho relata pela primeira vez em nosso meio, o isolamento desse microrganismo, como agente etiológico de infecção de cabelos humanos que ao exame clínico, simula "piedra blanca". Cabelos apresentando nódulos claros foram colhidos de paciente com 18 anos de idade. Em seguida clarificados com KOH a 20% entre lâmina e lamínula e observados no microscópio óptico comum e na microscopia eletrônica de varredura. Os cabelos foram semeados em ágar Sabouraud-glicose contendo 200 mg/l de cloransfenicol, incubados à 25°C por 5 dias. Após o isolamento da levedura, a mesma foi identificada utilizando-se técnicas micológicas usuais. O exame microscópico dos pêlos infectados revelou em algumas regiões o aumento do volume do cabelo, característico da tricorraxe nodosa. Em outras regiões os pêlos já se apresentavam fragmentados e, com relativa facilidade podia-se observar leveduras arredondadas com brotamento em base estreita. À microscopia eletrônica de varredura pode-se observar mais detalhadamente a descrição acima. A levedura isolada foi identificada como *Rhodotorula rubra*, sem atividade lipolítica. É importante ressaltar que a referida levedura foi isolada repetidas vezes em cultura pura dos cabelos infectados. Este achado clínico e laboratorial deve ser considerado, assim como deve merecer a devida atenção dos pesquisadores os isolamentos de *R. rubra* os quais permitirão um correto diagnóstico micológico e terapêutico adequada.

Palavras chaves: *Rhodotorula rubra*, *R. rubra* em cabelos

1 Seção de Micologia - Instituto Adolfo Lutz - Av. Dr. Arnaldo, 351 - 8º andar - 01246 - São Paulo - SP

2 Instituto de Ciência Biomédicas - Departamento de Microbiologia - Seção de Micologia - Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - 05508 - São Paulo - SP

INTRODUÇÃO

Leveduras comumente consideradas como contaminantes presentes no ar, água, solo, mucosas e pele estão sendo, cada vez com maior freqüência, encontradas em uma variedade de processos patogênicos (4, 5, 8, 10, 13).

Muitos desses microrganismos que estão associados a doenças humanas são incapazes de produzir infecção no indivíduo normal e para tanto, algumas alterações fisiológicas, de defesa celular do hospedeiro, bem como da microbiota normal, devem ocorrer antes da colonização, infecção ou produção de doença.

Rhodotorula é um dos gêneros de fungo oportunista freqüentemente encontrado como contaminante da pele (6, 7), pulmão, urina (1), fezes (11) e sistema nervoso central (8), sendo de grande significado quando presente no sangue (2, 10). As dermatites humanas causadas por *Rhodotorula* têm sido relatadas mas não documentadas (9).

O presente trabalho relata pela primeira vez, em nosso meio, a presença de *Rhodotorula rubra* em cabelos humanos produzindo infecção inicialmente semelhante à piedra branca e, posteriormente, diagnosticada como Tricorrex nodosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Cabelos apresentando nódulos claros foram colhidos de paciente de sexo masculino, com 18 anos de idade, e colocados em placa de Petri estéril. Em seguida, os cabelos foram clarificados com KOH a 20% entre lâmina e lamínula, para serem observados ao microscópio óptico comum. Também foi realizada microscopia eletrônica de varredura.

As amostras de cabelos foram semeadas em duplícata em ágar Sabouraud-glicose, contendo 200 mg/l de cloranfenicol e incubadas à 25°C por cinco dias.

Após o isolamento da levedura, a mesma foi identificada utilizando-se técnicas usuais. Também foram realizadas provas complementares para verificar a atividade lipolítica da levedura (Kreger-van Rij, 1984) (3).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O paciente em estudo, apresentou ao exame clínico, nódulos claros ao redor do cabelo, simulando piedra branca, cujo agente etiológico é *Trichosporon beigelli*. A referida lesão foi caracterizada posteriormente como Tricorrex nodosa, de



Foto 1 — Cabelos com nódulos claros simulando piedra branca.

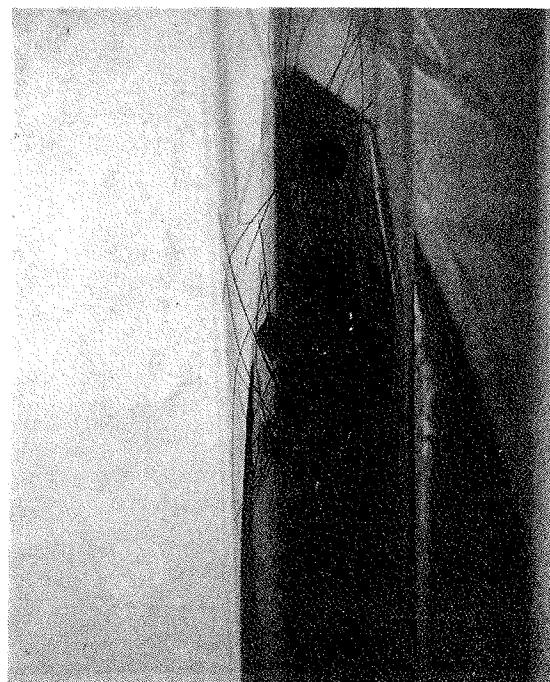


Foto 2 — Colônia de *Rhodotorula rubra* nos cabelos infectados. (ágar Sabouraud glicose, 25°C, 5 dias).

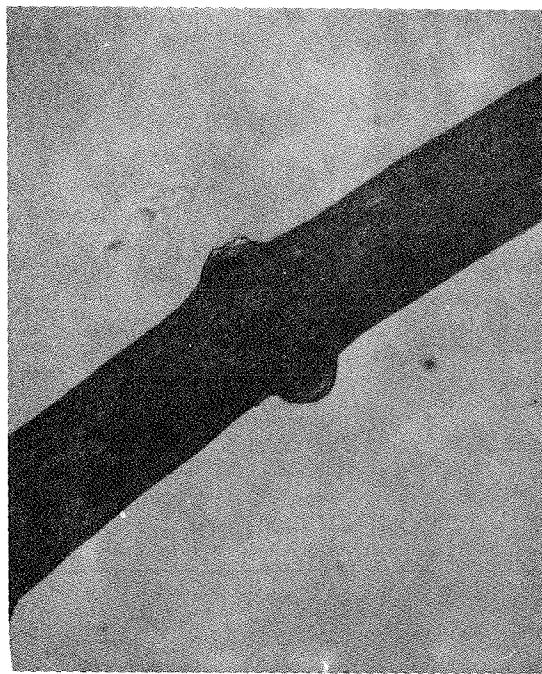


Foto 3A — Aumento de volume do cabelo ao microscópio óptico comum - (aumento 40X).



Foto 3B — Aumento do volume do pêlo observado sob microscopia eletrônica de varredura (aumento 110X).



Foto 4A — Presença de leveduras na região fragmentada do cabelo visto ao microscópio óptico comum - (aumento 40X).

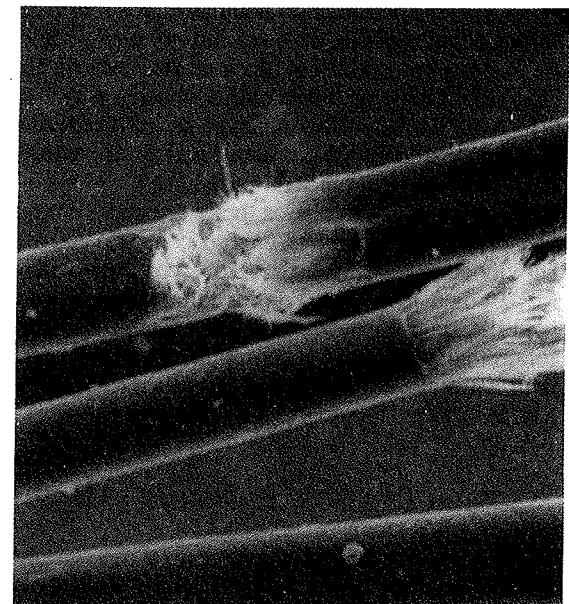


Foto 4B — Regiões fragmentadas do cabelo visto na microscopia eletrônica de varredura - (aumento de 200X).

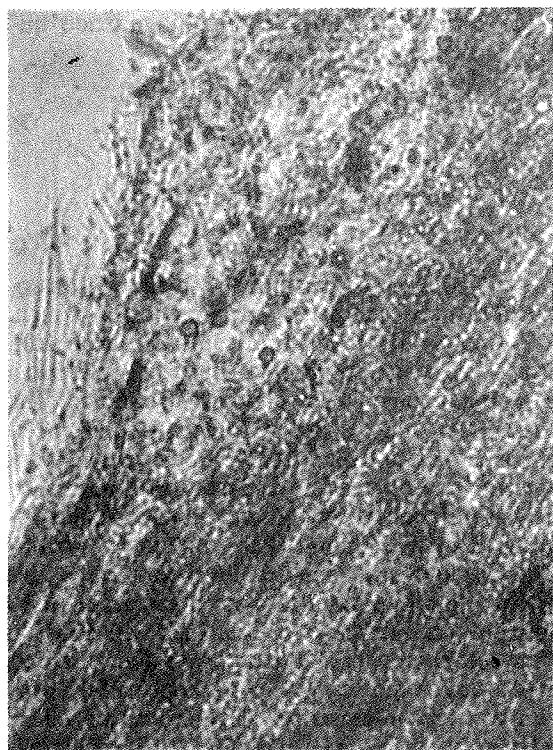


Foto 5A — Presença de leveduras com brotamento em base estreita vistas ao microscópio óptico comum - (aumento de 40X).

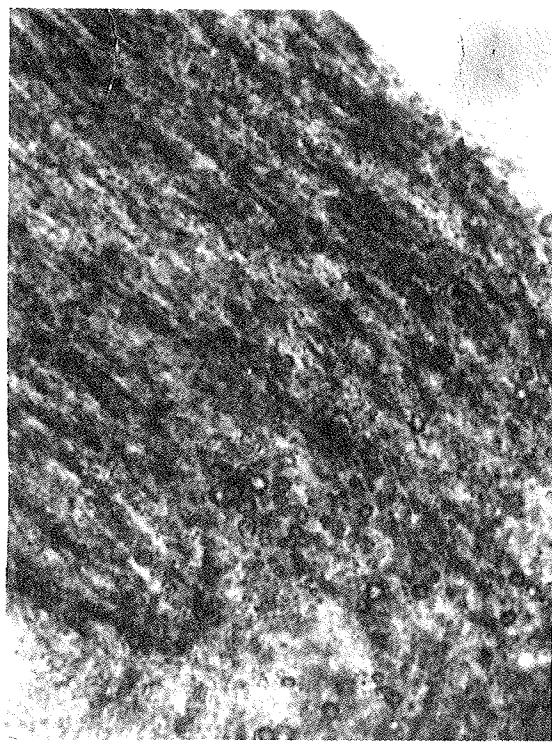


Foto 6A — Leveduras presentes no cabelo (aumento de 1000X).

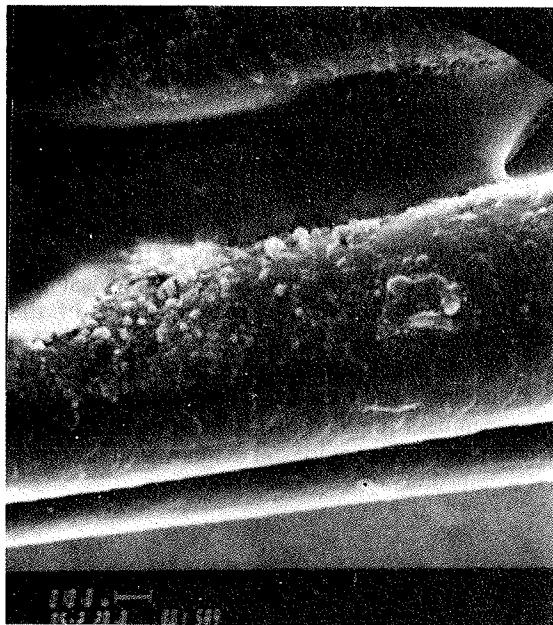


Foto 5B — Leveduras produzindo infecção inicial no cabelo visto na microscopia eletrônica de varredura - (aumento de 500X).

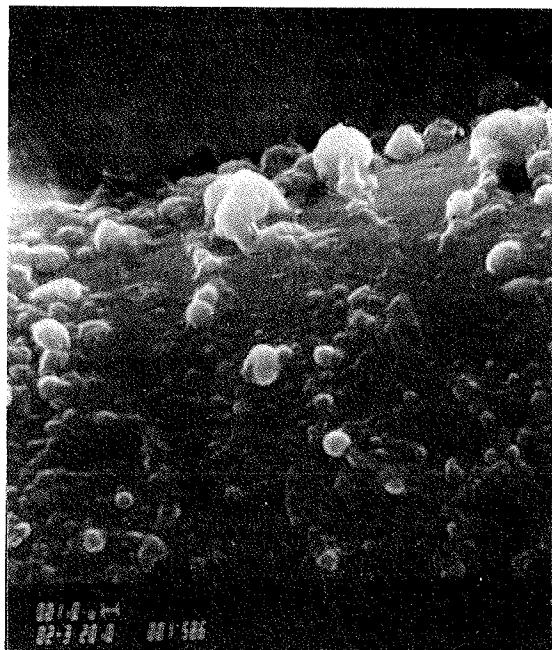


Foto 6B — Leveduras presentes no cabelo. Microscopia eletrônica de varredura - (aumento de 2000X).

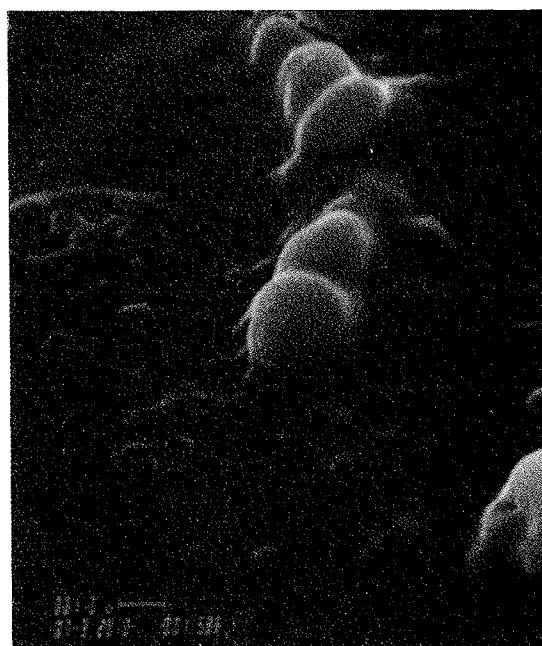


Foto 7 — Leveduras no cabelo, observadas sob microscopia eletrônica de varredura - (aumento de 7000X).

causa desconhecida, acreditando-se que traumas mecânicos ou químicos possam ser os fatores desencadeantes (12) (Foto 1).

O exame microscópico dos cabelos infectados revelou, em algumas regiões, o aumento do volume do mesmo, característica do Tricorrexo nodosa (Fotos 3A e 3B). Em outras, regiões os cabelos já se apresentavam fragmentados e, com relativa facilidade, podia-se observar leveduras arredondadas com brotamento em base estreita (Fotos 3A, 4A, 5A, 6A). À microscopia eletrônica de varredura pôde-se observar mais detalhadamente a descrição acima, bem como verificou-se também que o maior número de leveduras encontrava-se nas regiões aonde a lesão se apresentava em sua fase inicial em relação às regiões mais comprometidas (Fotos 4B, 5B, 6B, 7).

Nos cabelos que foram semeados em ágar-Sabouraud-glicose, observou-se após 5 dias de incubação, desenvolvimento de colônia de cor vermelho-alaranjada (Foto 2). A levedura foi identificada como *Rhodotorula rubra*, sem atividade lipolítica. É importante ressaltar que a referida levedura foi isolada repetidas vezes em cultura pura dos cabelos infectados.

Este achado clínico e laboratorial deve ser considerado, assim como deve merecer a devida atenção dos pesquisadores os isolamentos de *R. rubra* os

quais permitirão como correto diagnóstico micológico e terapêutica adequada.

SUMMARY

Similar white piedra by *Rhodotorula rubra*.

Rhodotorula rubra an opportunistic yeast associated to a series of pathological processes in man. It is frequently found as a saprophytic of skin, urine, faeces and central nervous system. It has a great importance when it is present in blood. The human dermatitis caused by *Rhodotorula* has been reported but not sufficiently documented. The present work relates for the first time in our country the isolation of this microorganism as an ethiological agent of human hair infection, which to clinical exam simulates "white piedra". The hair presenting white nodules were taken from a 18 year old patient. They were clarified with KOH at 20% between cover and glass cover and observed under the common optical microscope and to scanning electronic microscope. The hair was placed on sabouraud-glucose agar with 200 mg/l of chloramphenicol, incubated at 25°C for 5 days. After the isolation of the yeast, the same microorganism was identified using the usual micological techniques. The microscopic examination of the infected hair revealed in some regions the increase of the volume of the hair, a characteristic of tricorexe nodosa. In other regions, the hair was fragmented and a round cheped yeast, could be observed with narrow base beed. The scanning electronic microscope demonstrated the upper description with more detail.

The isolated yeast was identified as *Rhodotorula rubra*, without lipolytic activity. It is important to point out that the referred yeast was isolated several times in pure cultures of the infected hair.

This clinical and laboratorial founding must be considered, and it deserves the required attention of researchers for *R. rubra* isolations, since they permit a correct mycological diagnosis and adequate therapeutic.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Prof. Ruy G. Jafger da Faculdade de Odontologia da USP, pela documentação fotográfica obtida através de microscopia

eletrônica e ao Dr. Djalma Antonio Carmignotto, Médico-Dermatologista do Hospital das Clínicas da USP, São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahern, D. G.; Jamach, J. R. - Specification and densities of yeast in human urine specimens. *Sabouraudia*, 5: 110-119, 1966.
2. Kares, L. & Biava, M. F. - Levures isolées dans les hémocultures de 1962 a 1979 en laboratoire de mycologie du CHU de Nancy. *Bull Soc. Fr. Mycol. Med.*, 8: 153-155, 1979.
3. Kreger-van Rij, N. J. W. - *The yeasts, a taxonomic study*, 3nd. ed. N. York, Elsevier, 1984.
4. Lodder, J. - Die anaskosporogenen hefen verhande, Akad. Wetens chappen, Amsterdam, *Afdell Natureskund.*, 32: 1, 1934.
5. Lodder, J. - *The yeasts, a taxonomic study*, 2nd. ed. Amsterdam, North-Holland Publishing, 1970.
6. Mackenzie, D. W. H. - Yeasts from human sources.
7. McGinnis, M. R. & Rinaldi, M. G. - Mycotic flora of the interdigital spaces of the human foot: a preliminary investigation. *Mycopathologia*, 55: 47-52, 1975.
8. Pore, R. S. & Chen, J. - Meningitis caused by *Rhodotorula*. *Sabouraudia*, 14: 331-335, 1976.
9. Rippon, J. W. - *Medical Mycology. The pathogenic Fungi and the pathogenic actinomycetes*, 2^a ed. Philadelphia, Saunders, 1982.
10. Robineau, M. Y. & Boussongart, R. F. - Fongemie à *Rhodotorula* et septicemie à colibacilles. *Bull. Soc. Fr. Mycol. Med.*, 3: 195-198, 1974.
11. Saez, H. - Etude écologique sur les *Rhodotorula* des homothermes. *Rev. Med. Vet.*, 130: 903-908, 1979.
12. Sampaio, S. A. P. - *Tricosis in Dermatologia Básica*, 1^a ed. São Paulo, Estudo e Pesquisa Editora Ltda, 1974.
13. Wong, V. ; Ross, L.; Opas, L.; Lieberman, E. - *Rhodotorula rubra* peritonitis in a child undergoing intermittent cycling peritoneal dialysis. *J. Infect. Dis.*, 157: 383-94, 1988.

Recebido para publicação em 10/4/90

**BACILLUS CEREUS EM MACARRÕES INDUSTRIALIZADOS. II.
OCORRÊNCIA EM PRODUTOS COMERCIAIS E SUA MULTIPLICAÇÃO NO
ALIMENTO PREPARADO PARA CONSUMO***

Ivana C. Spolidório Mc Knight¹
Mauro Faber de Freitas Leitão² &
Renato Ferreira de Freitas Leitão²

RESUMO

Foi avaliada a freqüência de contaminação por *Bacillus cereus* em macarrões comerciais, com e sem ovos, constatando-se índices médios de 70,9%, oscilando entre 58,3 e 87,5% nas amostras com e sem ovos, respectivamente. O nível de contaminação com *B. cereus* foi variável, com 52,1% das amostras revelando populações na faixa $10^1/10^2$ UFC/g e 20,1% no intervalo $10^2/10^3$ UFC/g. O procedimento de cocção do macarrão (20 min em água a ebólition) mostrou-se altamente letal à bactéria, com sensível redução da microbiota de *B. cereus*. Por outro lado, o macarrão preparado demonstrou ser um ótimo substrato para a multiplicação de *B. cereus* que evidenciou um tempo de geração (g) médio de 45,9 min a 30°C. Nestas condições, populações potencialmente tóxicas ($\geq 10^7$ UFC/g) poderiam ser atingidas no macarrão preparado após 12,8, 7,60 e 2,55h de incubação a 30°C, considerando-se contaminações iniciais de 10^2 , 10^4 e 10^6 UFC/g, respectivamente.

Palavras chaves: *Bacillus cereus*, alimentos, macarrão, toxinfecção alimentar.

INTRODUÇÃO

Bacillus cereus é uma das bactérias mais comumente citadas como agente responsável por casos ou surtos de toxinfecções de origem alimentar, decorrentes principalmente do consumo de pratos preparados ricos em carboidratos, entre eles derivados de cereais, massas alimentícias, produtos de panificação, etc (1, 6, 8, 10, 20).

O processo patológico é caracterizado por duas síndromes distintas, uma diarréica e outra emética, sendo a sintomatologia provocada por toxinas diversas (10). No entanto, em ambos os casos é necessária a multiplicação prévia da bactéria no ali-

mento, de forma a se alcançar populações finais superiores a 10^7 UFC/g (8, 10).

O "habitat" principal desta bactéria é o solo e a superfície de vegetais, estando amplamente disseminada no ambiente natural, razão pela qual é facilmente isolada a partir de diferentes tipos de alimentos, sejam eles matérias-primas ou produtos já industrializados. A este respeito, Furlanetto (5), revisando pesquisas desenvolvidas no Brasil, menciona a presença freqüente de *B. cereus* em alimentos como produtos de merenda escolar, alimentos desidratados, carnes moídas, queijo frescal, etc.

Rabinovitch & col. (15), no Rio de Janeiro,

* Parte de tese de mestrado da autora principal; área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP, Piracicaba, SP.
1 Engº Agrônomo - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ-USP, Piracicaba, SP.
2 Instituto de Tecnologia de Alimentos-ITAL - Av. Brasil, 2880 - C.P. 139 - 13073 - Campinas, SP.

detectaram *B. cereus* em frutas e hortaliças, carnes e produtos cárneos, leite e derivados, cereais, condimentos, molhos preparados, produtos de confeitoria e de panificação.

Delazari & col. (4), analisando produtos institucionais, constataram que *B. cereus* era a bactéria potencialmente patogênica com maior incidência nas amostras analisadas.

Os inúmeros levantamentos efetuados tanto a nível nacional como internacional indicam que cereais e produtos derivados, como farinhas e amidos, estão entre os mais freqüentemente contaminados por *B. cereus*. Assim, Rogers (16), nos Estados Unidos da América, caracterizou como *B. cereus* 27,3% dos bacilos esporogênicos isolados a partir de farinhas de trigo. Já Kaur (11), na Inglaterra, examinando amostras de farinhas coletadas nos anos de 1978 a 1981, constatou índices de contaminação por *B. cereus* oscilando de 16 a 33%, com valores médios de 23,5%. No Brasil, Ubaldi Eiroa & col. (21), pesquisando farinhas e amidos, constataram que *B. cereus* era o enteropatógeno potencial isolado com maior freqüência, sendo que em alguns produtos a contagem média era superior a 10^2 UFC/g, com as percentagens de contaminação oscilando entre 6,6% (para a farinha de fubá) e 45% (para a farinha de mandioca). Também Delazari & col. (3), analisando 805 amostras de alimentos desidratados, positivaram índices máximos de contaminação por *B. cereus* em farinhas de milho, alcançando níveis de 90% de amostras positivas.

Estas considerações levam à suposição de que o macarrão seria um tipo de alimento industrializado passível de evidenciar contaminação freqüente por *B. cereus*. Quando se considera que este alimento é de amplo consumo pela população e as condições de seu preparo e manipulação nem sempre são adequadas no aspecto higiênico-sanitário, torna-se de interesse uma avaliação dos níveis de contaminação do produto oferecido ao consumidor.

Além disso, para uma melhor compreensão dos riscos eventuais deste tipo de alimento como veículo de toxinfecção alimentar seria fundamental um conhecimento sobre a influência das condições de preparo e armazenamento dos macarrões na sobrevivência e/ou multiplicação da bactéria.

Assim sendo, a presente pesquisa foi conduzida com os seguintes objetivos: a) Avaliação dos níveis de contaminação, por *B. cereus*, em massas alimentícias de diferentes tipos e produzidas comercialmente; b) Estimativa do potencial de multiplicação de *B. cereus*, durante o preparo das massas alimentícias para o consumo final.

MATERIAL E MÉTODOS

A. Avaliação da ocorrência de *Bacillus cereus* em macarrões produzidos comercialmente

Material

Foram analisadas amostras de macarrões comerciais de quatro marcas diversas, sendo duas delas de massas com ovos e duas sem adição dos mesmos. A partir da cada marca foi examinado um total de doze amostras, coletadas quinzenalmente e sempre em número de duas amostras por marca. Nestas condições, a cada quinze dias eram coletadas oito amostras diversas e, após três meses de estudo (6 épocas de amostragem), um total de quarenta e oito amostras foi efetivamente examinado.

• Isolamento e identificação de *Bacillus cereus*

Os exames dos macarrões foram efetuados com a separação de porções de 25 g das amostras, que foram imediatamente homogeneizadas em liquidificador, com adição de 225 ml de solução salina peptonada (8).

A partir da diluição inicial (10^{-1}) foram preparadas diluições decimais sucessivas no mesmo diluente, seguido de inoculação superficial de placas de Petri, contendo o meio vermelho fenol — gema de ovo-manitol-polimixina e com incubação das placas a 30°C durante 48 horas (8, 17).

Após a incubação, as placas preparadas nas várias diluições eram submetidas à contagem presumiva de colônias típicas de *B. cereus*, conforme citado por Speck (17) e ICMSF (8). Em continuação, um número representativo destas colônias era isolado em tubos de ágar nutritivo inclinado, seguido de incubação a 30°C durante 24 horas. A seguir, estas colônias eram submetidas aos seguintes exames morfológicos e bioquímicos, visando confirmar a presença de *B. cereus*: coloração de Gram, produção de esporos, motilidade (em gota pendente ou meio semi-sólido), crescimento rizóide, fermentação anacrómica de glicose, redução de nitrato, reação de Voges Proskauer e decomposição da tirosina. As culturas caracterizadas como bastonetes Gram-positivos, esporogênicos, móveis, sem crescimento rizóide, capazes de fermentar a glicose com produção de ácido, reduzindo o nitrato a nitrito, reação de Voges Proskauer positiva e decompondo a tirosina, eram consideradas como típicas de *B. cereus* (8, 17), calculando-se, com

base na percentagem de culturas confirmadas e nas contagens presuntivas nas diversas placas o número de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de *B. cereus* por grama das amostras analisadas.

B. Multiplicação de *B. cereus* durante o preparo do macarrão para consumo e armazenamento do alimento já preparado

Este estudo foi conduzido através de quatro experimentos diversos, sempre efetuados com duas repetições, a saber:

B.1. Processamento, inoculação, cocção e preparo de macarrão contaminado com aproximadamente 10^4 esporos de *B. cereus* /g

O macarrão utilizado neste experimento foi processado na planta-piloto do ITAL, com contaminação inicial por esporos de *B. cereus* da água utilizada no preparo da massa, de forma a assegurar uma população de 10^4 esporos/g no produto imediatamente após a trefilagem e antes da secagem.

A suspensão de esporos de *B. cereus* foi preparada pelo cultivo de cepa pertencente à coleção de culturas do ITAL em tubos contendo ágar nutritivo inclinado, com incubação a 30°C durante 72h. A seguir, o crescimento superficial era removido pela adição de 5 ml de água destilada estéril a cada tubo, sendo a suspensão resultante recebida em frasco Erlenmeyer contendo pérolas de vidro. Antes da utilização, a suspensão era submetida a um choque térmico (80°C durante 15 min), visando destruir as células vegetativas e ativar os esporos para germinação.

O fluxograma de processamento do macarrão obedeceu às seguintes etapas:

Homogeneização da massa (misturadeira FAMI) — Trefilagem e corte do macarrão (prensa extrusora BRAIBANTI) — Secagem (secador estático BRAIBANTI) — Embalagem (sacos plásticos).

Maiores detalhes com relação a esta etapa são descritos por Mc Knight *et alii* (12).

No experimento, foram separadas porções de 200 g de macarrão, seguido de adição de 1.800 ml de água, com posterior cocção à temperatura de ebulição, durante 20 minutos. Posteriormente, o excesso de água foi drenado, o macarrão foi acondicionado em bandejas de vidro (pirex), sendo as mesmas recobertas com filme plástico para evitar desidratação, seguido de armazenamento a 30°C durante 10 horas.

As contagens de *B. cereus* foram efetuadas nos intervalos de 0, 5 e 10h de incubação, sendo utilizado o ágar vermelho fenol-gema ovo-manitol-polimixina, conforme descrito anteriormente na pesquisa de macarrões industrializados.

B.2. Processamento, cocção e preparo de macarrão, com posterior inoculação de 10^3 esporos de *B. cereus* /g

Inicialmente, cocção de amostras de macarrão, nas quantidades, proporções e procedimento de preparo idênticos aos descritos em B.1. A seguir, no produto já pronto para o consumo e resfriado, foi feita a inoculação de esporos de *B. cereus*, na proporção aproximada de 10^3 esporos/g, com posterior distribuição do macarrão em bandejas de vidro e armazenamento a 30°C durante 10 horas.

As contagens de *B. cereus* foram efetuadas nos intervalos de 0, 5 e 10 horas de incubação, de forma idêntica à relatada em B.1.

Neste experimento procurou-se ainda avaliar a velocidade de multiplicação de *B. cereus* no macarrão inoculado, determinando-se, tentativamente, o tempo de geração (g) da bactéria com base nas contagens efetuadas nos diferentes intervalos, usando-se o procedimento recomendado por Stanier & col. (18).

B.3. Inoculação de macarrão, com aproximadamente 10^3 esporos/g, seguido de cocção e preparo.

Neste experimento, foram inoculadas porções de 200 g de macarrão com uma suspensão de esporos de *B. cereus*, de forma a obter-se um nível de contaminação de aproximadamente 10^3 esporos/g. A seguir o macarrão inoculado foi homogeneizado com auxílio de bastão de vidro, seguido de secagem à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em continuação, o produto inoculado foi submetido à cocção e preparo, de maneira similar à descrita em B.1, sendo o produto final acondicionado em bandejas de vidro, armazenado a 30°C e com contagem de *B. cereus* nos intervalos de 0, 5 e 10h.

B.4. Presença de esporos de *B. cereus* na água drenada após a inoculação e cocção do macarrão

Neste experimento, procurou-se avaliar a presença de esporos de *B. cereus* na água drenada após a cocção e preparo do macarrão. Os procedimentos de inoculação do macarrão e cocção foram idênticos

aos descritos em B.3, sendo feitas contagens de esporos na água imediatamente após o término da cocção (20 min em água a ebulição), conforme metodologia descrita em B.1.

RESULTADOS

A. Avaliação da ocorrência de *B. cereus* em macarrões produzidos comercialmente

Os resultados obtidos no levantamento da presença de *B. cereus* em amostras de macarrão comerciais constam da Tabela 1.

Tabela 1 — Incidência de *Bacillus cereus* em macarrões produzidos comercialmente.

Tipo macarrão	Marcas	Nº de amostras examinadas	Amostras contaminadas com <i>B. cereus</i>		%
			Nº	%	
Com ovos	I	12	6	50,0	
	II	12	8	66,7	
Sem ovos	I	12	9	75,0	
	II	12	12	100,0	
Total		48	35	72,9	

De início, pôde-se observar que a percentagem média de contaminação dos macarrões produzidos comercialmente foi maior para as amostras sem ovos (87,5%), sendo que para as pertencentes à marca II evidenciou-se a presença da bactéria em todas as amostras analisadas. Já nas amostras com ovos, a percentagem de contaminação foi menor, alcançando valores médios de 58,4%.

Na Tabela 2 pode-se observar a variação da população de *B. cereus* nas amostras de macarrão examinadas.

Tabela 2 — Distribuição da população de *Bacillus cereus* em amostras de macarrão comercial.

Tipo de amostra comercial	Marca	Nº de amostras analisadas	Distribuição da microbiota de <i>B. cereus</i> (UFC/g)					
			<10 ¹	10 ¹ - 10 ²	10 ² - 10 ³	<10 ¹	10 ¹ - 10 ²	10 ² - 10 ³
Com ovos	I	12	6	50,0	4	33,3	2	16,7
	II	12	4	33,3	7	58,3	1	8,3
Sem ovos	I	12	3	25,0	7	58,3	2	16,7
	II	12	0	—	7	58,3	5	41,7
Total		48	13	27,1	25	52,1	10	20,8

Novamente constata-se que nas amostras positivas, a população de *B. cereus* era usualmente baixa, predominando valores na faixa 10¹/10², comparativamente àqueles acima de 10² UFC/g.

Além disso, os macarrões com ovos revelaram populações mais baixas do que aqueles sem ovos. Assim, enquanto, em média, 12,5% das amostras com ovos apresentavam populações na faixa 10²/10³ UFC/g, 29,2% das sem ovos evidenciaram resultados nesta mesma faixa.

B. Multiplicação de *B. cereus* durante o preparo do macarrão para consumo e armazenamento do alimento já preparado

Conforme descrito anteriormente em Material e Métodos, foi realizado um total de 4 experimentos diversos, procurando avaliar o efeito do processo de cocção e preparo do macarrão, bem como de seu armazenamento posterior, na microbiota de *B. cereus* contaminante do alimento.

Na Tabela 3 são mencionados os resultados obtidos nos ensaios de cocção e preparo de macarrão originalmente contaminado com aproximadamente 10⁴ esporos de *B. cereus* /g.

Tabela 3 — Contagens de *B. cereus* em macarrão originalmente contaminado, após cocção, preparo e armazenamento a 30°C.

Etapa	Contagens de <i>B. cereus</i> (UFC/g)	
	Ensaio 1	Ensaio 2
Macarrão seco, antes da cocção	5,9 x 10 ²	6,7 x 10 ²
Macarrão imediatamente após cocção	<10	<10
Macarrão após cocção e armazenamento por 5 h a 30°C	<10	<10
Macarrão após cocção e armazenamento, após 10 h a 30°C	3,2 x 10 ³	2,6 x 10 ³

Os resultados evidenciam claramente que o procedimento de cocção do macarrão (20 min a ebulição) teve um efeito deletério sobre a microbiota de *B. cereus*, embora não havendo destruição total dos esporos presentes, já que após 10h de incubação a 30°C contagens positivas eram novamente obtidas.

Na Tabela 4 constam os resultados obtidos em macarrão cozido e resfriado, com posterior inocu-

Tabela 4 — Contagens de *B. cereus* em macarrão cozido, resfriado e posteriormente inoculado com 10^3 esporos da bactéria, seguido de armazenamento a 30°C .

Período de incubação (h)	Contagens de <i>B. cereus</i> (UFC/g)	
	Ensaios 1	Ensaios 2
0	$3,2 \times 10^3$	$6,7 \times 10^2$
5	$1,3 \times 10^5$	$5,4 \times 10^3$
10	$2,6 \times 10^7$	$6,1 \times 10^6$

lação de 10^3 esporos de *B. cereus*/g, seguido de armazenamento a 30°C .

Os resultados obtidos demonstraram ser o macarrão cozido um bom substrato para a multiplicação de *B. cereus*.

Com base nestes resultados, calculou-se o tempo de geração (g) da bactéria, obtendo-se valores de 46,2 e 45,6 min, nos ensaios 1 e 2, respectivamente.

Nos ensaios de inoculação do macarrão seco com aproximadamente 10^3 esporos de *B. cereus*/g, seguido de cocção, preparado e armazenamento, os resultados alcançados evidenciaram novamente o efeito prejudicial da cocção do macarrão nos esporos de *B. cereus* contaminantes. Assim, partindo de contagens iniciais de $3,7 \times 10^3$ e $1,9 \times 10^3$ UFC/g, nos ensaios 1 e 2, respectivamente, não se conseguiu detectar microrganismos sobreviventes no macarrão cozido mesmo após 5 e 10h de armazenamento a 30°C .

Finalmente, no último experimento, procurou-se avaliar a presença de esporos de *B. cereus* na água drenada após a cocção e preparo de macarrão originalmente contaminado.

Partindo de amostras inoculadas de macarrão, contendo *B. cereus* em números de $1,2 \times 10^3$ e $1,4 \times 10^3$ UFC/g, nos ensaios 1 e 2, respectivamente, não se conseguiu detectar sobreviventes na água de drenagem remanescente do processo de cocção, obtendo-se, invariavelmente, contagens inferiores a 10 UFC/ml.

DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no estudo da contaminação de macarrões industrializados por *B. cereus* evidenciaram a presença constante da bactéria, embora em números normalmente não muito elevados. É interessante a constatação de que a presença de ovos na formulação não resultou em aumento nos índices de contaminação; cabe, no entanto, destacar que as amostras de macarrões com ovos eram procedentes de firmas de grande porte, com investi-

mentos em controle de qualidade, o que não ocorria nas amostras de macarrões sem ovo. Assim sendo, é possível que as variações nas condições higiênico-sanitárias de produção e no rigor aplicado ao controle de qualidade das matérias-primas e ingredientes possam explicar parcialmente estas diferenças nos índices de contaminação.

Dentre as matérias-primas utilizadas na elaboração dos macarrões, a farinha de trigo constitui-se, provavelmente, no principal veículo de *B. cereus*, conforme evidenciado por inúmeros trabalhos efetuados no Brasil e exterior (11, 15, 21). Outro aspecto importante é que a eventual multiplicação da bactéria somente ocorre nas fases iniciais do processamento, ou seja, nas operações de preparo da massa, onde água e/ou ovos são adicionados a farinha, seguido de trefilagem e início da secagem; conforme comprovado por Mc Knight (12), após 3 h de secagem, o macarrão já apresenta atividade de água inferior a 0,92, impedindo, assim, a multiplicação de *B. cereus*.

Os padrões microbiológicos fixados pela Portaria 001 de 27 de janeiro de 1987 da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos — DINAL estabelecem que para massas alimentícias secas, com ou sem ovos e sem recheio, é tolerável a contaminação máxima por *B. cereus* de 10^3 UFC/g. Comparando-se este limite com os resultados constantes da Tabela 2, observa-se que 100% das amostras analisadas satisfaziam à legislação vigente.

No entanto, a avaliação do significado e risco potencial de um alimento no aspecto de saúde pública não deve limitar-se apenas ao estudo da sua contaminação inicial, mas também a uma estimativa da sua adequação como substrato para a multiplicação dos contaminantes (veículo ativo ou passivo) e condições usuais de manipulação e manutenção a que é submetido após o seu preparo. Assim sendo, os dados obtidos na segunda fase do projeto merecem uma maior discussão.

De início, os experimentos referentes à cocção e preparo de macarrão previamente inoculado com esporos de *B. cereus* (experimentos B.1 e B.3) demonstraram de forma nítida que as condições de tratamento térmico (20 min a ebólition) tinham um efeito deletério sobre os esporos contaminantes. Assim, no experimento B.1, contagens de *B. cereus* somente foram constatadas após 10 h de incubação do macarrão a 30°C , ao passo que no experimento B.3 tal fato não foi verificado mesmo após este período de incubação.

Dados experimentais indicam que células vegetativas de bactérias são facilmente destruídas em

temperaturas acima de 65-70°C (19), evidentemente não sobrevivendo às condições de cocção do macarrão. Por outro lado, os esporos e entre eles os de *B.cereus* são bem mais resistentes, embora com variações em função do substrato de aquecimento e da cepa específica da bactéria.

Segundo Stumbo (19), os valores "D₁₂₁" oscilariam entre 0,03 e 2,37 min, com "z" variando de 7,9 a 9,9°C. De acordo com Gilbert & col. (7) e Parry & Gilbert (14), os valores "D₉₅" para *B.cereus* variam entre 2,5 a 36,2 min e 5,0 a 36,0 min, respectivamente. Já Johnson & col. (9) constataram valores menores, entre 1,2 a 20,2 min a 95°C, com acentuada variação entre diferentes cepas.

A menção destes dados evidencia claramente que temperatura na faixa de 100°C tem, definitivamente, um efeito letal sobre os esporos de *B.cereus*, com intensidade variável em função da cepa em estudo. Assim sendo, os resultados obtidos nos experimentos B.1 e B.3 e os dados da Tabela 3 parecem coerentes com estas observações.

Com base nesta Tabela, a redução da população inicial de esporos em 2 ciclos log (2 "D") já resultaria em uma microbiota sobrevivente de 5,9 e 6,7 esporos de *B.cereus*/g, nos ensaios 1 e 2, respectivamente, impossível de ser detectada pela metodologia de contagem utilizada, que assegura a enumeração de uma microbiota mínima de 10 UFC/g.

Por outro lado, a obtenção de contagens após 10 h de armazenamento evidencia que o processo de cocção, embora de elevada letalidade, não conduziu à destruição completa da microbiota contaminante.

No entanto, os resultados indicam que os riscos de intoxicação alimentar pelo consumo de macarrões originalmente contendo populações de *B.cereus* na faixa de 10²-10³ UFC/g seriam relativamente remotos, uma vez que, mesmo após o armazenamento durante 10 h a 30°C, populações reduzidas, na faixa de 10³ UFC/g foram atingidas, estando muito abaixo daquelas passíveis de provocar toxinfecção.

Os resultados obtidos nos ensaios de contagens de esporos de *B.cereus* na água de drenagem proveniente da cocção do macarrão (experimento B.4) confirmaram que as baixas contagens nos macarrões após a cocção eram devidas, fundamentalmente, ao efeito térmico letal e não a uma ação de lavagem dos esporos presentes nas massas. A ausência de detecção de *B.cereus* na água de drenagem mesmo em amostras de macarrões contaminados com 10³ esporos/g corroborou esta afirmativa.

Os resultados observados no experimento de inoculação do macarrão após cocção e preparo (ex-

perimento B.2) evidenciaram ser este alimento um bom substrato para a multiplicação de *B.cereus*.

Os dados contidos na Tabela 4 confirmaram que após incubação dos macarrões inoculados durante 10 h atingiam-se populações de 2,6 x 10⁷ e 6,1 x 10⁶ UFC/g nos ensaios 1 e 2, respectivamente, com tempos de geração (g) da bactéria de 46,2 e 45,6 min, respectivamente.

A rápida multiplicação de *B.cereus* em substratos ricos em amido já foi constatada por outros autores, entre eles Morita & Woodburn (13), que verificaram que populações na faixa de 10⁵ UFC/g eram atingidas em arroz cozido após 7 a 20 h a 23°C e 3 a 9 h a 43°C.

Bryan (2) num estudo sobre os principais fatores responsáveis por surtos de toxinfecções de origem alimentar nos Estados Unidos da América, no período de 1977-1982, destacou que a refrigeração inadequada, manutenção de pratos preparados à temperatura ambiente e espaço de tempo superior a 12 h entre preparo e consumo do alimento foram fatores responsáveis por 40,9, 21,1 e 25,2% dos surtos registrados, respectivamente.

Estes dados são importantes, quando se considera que provêm de país tecnologicamente adiantado e tradicionalmente rigoroso quanto às exigências higiênico-sanitárias de manipulação dos alimentos.

Nestas condições, o procedimento experimental de inocular pratos preparados, seguido de manutenção à temperatura de 30°C, na verdade simula bem uma prática constatada freqüentemente na realidade de cozinhas e restaurantes industriais.

Inquéritos epidemiológicos têm revelado que alimentos contendo populações de *B.cereus* iguais ou superiores a 10⁷ UFC/g são potencialmente tóxicos (8).

Os dados experimentais da Tabela 4 permitiram a determinação do tempo médio de geração ($g = 45,9$ min) e da razão de crescimento ($\mu = 0,90\text{ h}^{-1}$) do *B.cereus* desenvolvendo-se em macarrão a 30°C. Com base nestes dados, pode-se construir uma tabela em que se determina o espaço de tempo decorrente até que populações de *B.cereus* que ofereçam risco ao eventual consumidor do alimento sejam atingidas. Em outras palavras, pode-se calcular o tempo necessário para um alimento infectado tornar-se infeccioso ou tóxico. A Tabela 5 elucida melhor estas considerações.

Assim, para níveis baixos de contaminação (10² UFC/g) populações de risco seriam alcançadas após 12,8 h de armazenamento, reduzindo-se este espaço de tempo para apenas 7,6 h quando populações de 10⁴ UFC/g estivessem presentes inicialmente.

Tabela 5 — Relação entre grau de contaminação inicial e período de armazenamento do macarrão a 30°C, necessário para que populações de *B. cereus* na ordem de 10⁷ UFC/g sejam alcançadas.

Contaminação inicial (UFC/g)	Período de armazenamento (h)
10 ²	12,80
10 ³	10,20
10 ⁴	7,60
10 ⁵	5,11
10 ⁶	2,55

Observação: Valores calculados assumindo uma razão de crescimento (μ) = 0,90h⁻¹.

Quando se considera a precariedade das condições de manipulação de alimentos em nosso meio, comprehende-se que tais níveis de contaminação não seriam difíceis de se constatar.

Em conclusão, os resultados da presente pesquisa revelaram a elevada ocorrência de *B. cereus* no macarrão industrializado, embora em níveis de contagem relativamente baixos. Por outro lado, comprovou-se que os procedimentos de cocção do macarrão são altamente deletérios à bactéria. No entanto, o macarrão preparado revelou-se um ótimo substrato para a multiplicação do microrganismo, possibilitando que populações potencialmente tóxicas fossem atingidas após curto período de armazenamento em condições favoráveis à bactéria.

SUMMARY

Bacillus cereus in Macaroni. II. Occurrence in commercial products and evaluation of its behavior in the prepared food

The presence of *B. cereus* was evaluated in commercial macaroni samples, made with and without eggs. A total of 48 samples were analysed, with 8 samples being collected at 15 days intervals during a 3 months period.

The presumptive *B. cereus* count was made in phenol red egg yolk-polymyxin agar with incubation at 30°C during 48 h. Typical colonies were isolated in nutrient agar slants and submitted to the following tests: Gram strain, spore formation, motility, cultural aspect, glucose fermentation, nitrate reduction, Voges Proskauer reaction and tyrosine utilization.

Cultures characterized as Gram positive spore-forming rods, motile, without rhizoid growth, fer-

menting glucose, reducing nitrate, decomposing tyrosine and with a positive V. Proskauer reaction were confirmed as *B. cereus*.

The average contamination frequency by *B. cereus* was 70.9%, varying between 58.3 and 87.5% in macaroni samples made with and without eggs, respectively. It was noticed that 52.1% of the samples showed populations between 10¹ and 10² CFU/g and 20.1% between 10² and 10³ CFU/g.

The cooking procedures of the macaroni for final consumption (20 min in boiling water), showed a lethal effect to *B. cereus* with a high reduction of the initial population. However, after being prepared, the macaroni was a good substrate for *B. cereus* growth, with an average generation time (g) = 45.9 min at 30°C. This result would permit reaching a potentially toxic population ($\geq 10^7$ CFU/g) after 12.8, 7.6 and 2.5h storage at 30°C, for initial contamination levels of 10², 10⁴ and 10⁵ CFU/g respectively.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beckers, H. J. Incidence of foodborne disease in the Netherlands — annual summary 1980. *J. Food Prot.* 48 (2): 181-187, 1985.
- Bryan, F. L. Risks of practices, procedures and processes and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J. Food Prot.* 51 (8): 663-763, 1988.
- Delazari, I.; Leitão, M. F. F.; Geraldini, A. M.; Ubaldi Eiroa, M. N. & Santos, C. A. M. *Bacillus cereus* em alimentos desidratados. *Boletim ITAL, Campinas*, 60: 31-40, 1978.
- Delazari, I.; Leitão, M. F. F.; Pereira, L.; Ubaldi Eiroa, M. N. & Santos, C. A. M. Microbiologia de produtos institucionais. *Boletim ITAL, Campinas*, 17 (3): 315-325, 1980.
- Furlanetto, S. M. P. Dados sobre a presença em alimentos ou multiplicação em alimentos, de bactérias responsáveis por intoxicações de origem alimentar no Brasil. *Seminário Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, p. 167-170, 1989.
- Gilbert, R. J. *Bacillus cereus* gastritis, in: Riemann, H. & Bryan, E. L., ed., *Foodborne infections and intoxications*, 2^a ed., New York, Academic Press, 1979.
- Gilbert, R. J.; Stringer, M. F. & Peage, T. C. The survival and growth of *Bacillus cereus* in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning. *J. Hyg.*, London, 73 (3): 433-444, 1974.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods — ICMSF, *Microorganisms in Foods. Their significance and methods of enumeration*. 2^a ed., Toronto, University of Toronto Press, 1978.
- Johnson, K. M.; Nelson, C. L. & Busta, F. F. Germination and heat resistance of *Bacillus cereus* spores from strains associated with diarrheal and emetic foodborne illnesses. *J. Food Sci.*, 47 (4): 1268-1291, 1982.

10. Johnson, K. M. *Bacillus cereus* foodborne illness: an update. *J. Food Prot.*, **47** (2): 145-153, 1984.
11. Kaur, P. Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. *J. Appl. Bacteriol.*, London, **60** (6): 513-516, 1986.
12. Mc Knight, I. C. S.; Leitão, M. F. F. & Leitão, R. F. F. *Bacillus cereus* em macarrões industrializados. I. Efeito das condições de processamento na sua multiplicação. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **10** (1): 137-155, 1990.
13. Morita, T. N. & Woodburn, M. J. Stimulation of *Bacillus cereus* growth by protein in cooked rice combination. *J. Food Sci.*, **42** (5): 1232-1235, 1977.
14. Parry, J. M. & Gilbert, J. R. Studies of the heat resistance of *Bacillus cereus* spores and growth of the organism in boiled rice. *J. Hyg.*, London, **84**: 77-82, 1980.
15. Rabinovitch, L.; Vicente, M. M. A.; Guaicurus, T. V.; Freitas, J. P. G. V. & Mesquita, R. P. Avaliação da incidência e da toxicidade de amostras de *Bacillus cereus* em diferentes classes de alimentos comercializados e consumidos no Estado do Rio de Janeiro.
16. Rogers, R. F. *Bacillus cereus* isolated from refrigerated doughs, wheat flour and wheat. *Cereal Chem.* **55** (5): 671-674, 1978.
17. Speck, M. L. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, 2^a ed., Washington, APHA, 1976.
18. Stanier, R. Y.; Adelberg, A. E. & Ingraham, J. *The microbial world*, 4^a ed., Englewood Cliffs, Prentice-Hall, 1976.
19. Stumbo, C. R. *Thermobacteriology in food processing*, 2^a ed., New York, Academic Press, 1973.
20. Todd, E. C. D. Foodborne and waterborne disease in Canada, 1979. Annual summary. *J. Food Prot.*, **48** (2): 1071-1078, 1985.
21. Ubaldi Eiroa, M. N.; Leitão, M. F. F.; Leitão, R. F. F. & Vitti, P. Caracterização microbiológica de farinhas e amidos. *Col. ITAL*, Campinas, **6**: 459-473, 1975.

Recebido para publicação em 20/3/90

SOBREVIVÊNCIA DE *SALMONELLA* spp EM QUEIJO MINAS PADRONIZADO DURANTE A MATURAÇÃO

Maria de Fátima Borges¹
Sebastião Cesar Cardoso Brandão²
Adão José Rezende Pinheiro²

RESUMO

O estudo teve por objetivo o acompanhamento da sobrevivência de uma população mista de *Salmonella typhi*, *S. typhimurium* e *S. dublin* em queijos Minas Padronizado durante a maturação. A mistura de *Salmonella* spp foi inoculada ao leite cru previamente à elaboração dos queijos. Elaborou-se quatro tipos de queijos Minas Padronizado, os quais representaram os seguintes tratamentos: a) queijo de leite pasteurizado (controle); b) queijo de leite cru; c) queijo de leite cru tratado com 200 mg/l de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e d) queijo de leite cru tratado com 500 mg/l de H_2O_2 . Os queijos elaborados foram maturados à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ C$) por um período de 60 dias. Nesse período, a intervalos de 15 dias, os queijos foram avaliados quanto a presença ou ausência de *Salmonella*, contagem padrão em placas (UFC/g), coliformes totais (NMP/g) e pH. No primeiro dia de maturação também foi avaliado os teores de gordura e umidade dos queijos. As salmonelas sobreviveram, nos queijos, por um período de 30-45 dias de maturação, independente dos tratamentos com H_2O_2 . Isso sugere que as transformações bioquímicas que ocorreram durante a maturação tornaram o queijo meio desfavorável à sobrevivência desse grupo de bactérias patogênicas. A contagem da população de bactérias mesófilas reduziu gradualmente, de $7,0 \times 10^7$ a $4,4 \times 10^4$ UFC/g, durante o período de maturação dos queijos. Os tratamentos do leite cru com 200 e 500 mg/l de H_2O_2 foram eficazes na destruição dos microorganismos produtores de gás do grupo coliforme, o que previu o estufamento precoce dos queijos durante a maturação. O teor de gordura dos queijos não foi afetado pelos tratamentos com H_2O_2 . Por outro lado, esses tratamentos com H_2O_2 , aumentaram significativamente o teor de umidade dos queijos. A cultura láctica utilizada apresentou boa qualidade e conferiu alta acidez aos queijos. Nestes, no primeiro dia de maturação, os valores de pH variaram entre 4,65 e 4,69. A partir daí, esses valores aumentaram gradualmente, chegando aos 60 dias de maturação dos queijos, entre 5,52 e 5,60.

1 Centro Nacional de Pesquisa de Mandioca e Fruticultura - EMBRAPA Caixa Postal 007 44380 - Cruz das Almas-BA, Brasil.

2 Deptº de Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa - Campus Universitário 36570 - Viçosa - MG, Brasil.

INTRODUÇÃO

O queijo tem se destacado entre os derivados lácticos pelo seu alto teor de proteínas, entre outros nutrientes. Com o desenvolvimento tecnológico de sua produção surgiu, a nível nacional inúmeras variedades, muitas delas com significado apenas local, a exemplo do queijo Minas, o qual é de maior consumo nacional, depois dos queijos Prato e Mussarela. Esse queijo, que inclui os tipos Minas Frecal e Minas Padronizado (curado), é obtido, em porção considerável, a partir de leite cru, principalmente nos estabelecimentos artesanais e pequenas indústrias. Essa porção, que é produzida sem necessários cuidados higiênicos-sanitários, além do inadequado armazenamento e transporte, constitui, consequentemente, risco à saúde do consumidor, em razão da fácil contaminação por microorganismos. Entre eles, ressaltam-se as bactérias do gênero *Salmonella*, as quais podem proliferar tanto na matéria-prima como no produto resultante do processo (1).

As salmonelas nos alimentos constituem sério problema à Saúde Pública por causarem toxinfecção alimentar (5, 7, 9, 15). Vários pesquisadores (10, 16, 18, 24) atribuíram, também a ocorrência de surtos de salmonelose ao consumo de vários tipos de queijos, como Cheddar, Blue Vein, Greek, Brynza, Cottage, fabricados a partir de leite cru ou de leite pasteurizado recontaminado. Os queijos sofrem no entanto, várias transformações bioquímicas durante a fase de maturação inibindo o crescimento de organismos patogênicos (6). O Ministério da Agricultura (3) recomenda o consumo de queijos de leite cru após 90 dias de maturação.

Considerando a inexistência de dados sobre a ocorrência de salmonelose causada pelo consumo de queijo Minas, obtido de leite cru e julgando que as bactérias causadoras dessa enfermidade representam um grande risco à saúde do consumidor, efetuou-se o presente trabalho com o objetivo de acompanhar a viabilidade de uma população mista (10^5 cel./ml) de *S. typhi*, *S. tymphimurium* e *S. dublin* em queijo Minas Padronizado, durante a maturação.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima — O leite utilizado na elaboração dos queijos foi coletado ao acaso, na usina de laticínios da Universidade Federal de Viçosa-MG. Em cada repetição, amostrou-se 30 litros de leite

cru e 10 de leite pasteurizado. Essas amostras de leite foram caracterizadas quanto a contagem padrão em placa, coliformes totais, teor de gordura e pH, segundo metodologia proposta pelo "Standard methods for the examination of dairy products" (15). Os resultados dessa caracterização estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 — Valores médios das características microbiológicas e químicas do leite utilizado na elaboração dos queijos.

Tipo de leite	Contagem Padrão em placas (UFC/ml)	Coliformes totais (NMP/ml)	Gordura (%)	pH
Pasteurizado	$4,7 \times 10^3$	Ausência	3,2	6,59
Cru	$2,1 \times 10^6$	$5,2 \times 10^3$	4,0	6,47

Elaboração dos queijos — Elaborou-se quatro tipos de queijos Minas Padronizado, com três repetições, representados pelos seguintes tratamentos: a) queijo de leite pasteurizado (controle); b) queijo de leite cru; c) queijo de leite cru tratado com 200 mg/l de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e d) queijo de leite cru tratado com 500 mg/l de H_2O_2 . O leite cru destinado aos tratamentos b, c e d foi inoculado com população mista de *Salmonella typhi*, *S. typhimurium* e *S. dublin*, obtida de culturas puras fornecidas pelo Departamento de Bacteriologia da Fundação Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — RJ. O inóculo foi preparado a partir de uma cultura das três espécies de *Salmonella* repicadas em caldo nutritivo e incubadas a $35 \pm 2^\circ C$ por 4 horas. Foi determinada a absorbância a 420 nm (espectrofotômetro Bauch & Lomb Spectronic 20), por meio da qual calculou-se a população de bactérias por mililitro da cultura. Em seguida, esta foi adicionada, ao leite cru, em quantidade suficiente para obter uma população de, aproximadamente, 10^5 cel./ml. A correlação entre absorbância e população bacteriana foi determinada, pela curva de crescimento de cada espécie de *Salmonella* bem como da mistura das mesmas, efetuando-se a contagem de *Salmonella* em placas (técnica da microgota) paralelamente às leituras de absorbância.

Nos tratamentos c e d, após a estabilização do inóculo, foi adicionado 200 e 500 mg/l de H_2O_2 padronizado, respectivamente, por uma hora a $32^\circ C$, estes tratamentos receberam catalase comercial, obtida de fígado bovino (Sigma Chemical Company USA), em quantidade suficiente, de acordo com sua atividade, para decompor o H_2O_2 remanescente em 20 minutos. Essa decomposição foi confirmada

pela reação de amido-iodeto de potássio (13).

A seguir, procedeu-se à elaboração dos queijos Minas Padronizado conforme, metodologia tradicional (19) com algumas adaptações necessárias aos propósitos dos tratamentos c e d. Nestes tratamentos, utilizou-se três vezes a quantidade de cultura láctica (*Streptococcus lactis* e *S. cremoris*) recomendada e duas vezes a de coalho (HA-LA-Christiaan Hansen) para coagular o leite.

Análise dos queijos durante a maturação — Os queijos foram maturados à temperatura ambiente, durante 60 dias. Neste período, os mesmos foram submetidos a avaliações microbiológicas, físicas e químicas.

A pesquisa microbiológica baseou-se na contagem total em placas (UFC/g), coliformes totais (NMP/g) e na confirmação da presença ou ausência de *Salmonella*. Esta pesquisa foi efetuada a intervalos de 15 dias, durante 60 dias. Amostra representativa de 25g de queijo, retirada com auxílio de um coletor de amostra de 5 cm de profundidade, foi adicionada a 225ml de água peptonada tamponada estéril e misturada em liquidificador (copo de vidro, previamente esterilizado) a baixa rotação, por 2 minutos, procurando evitar aquecimento excessivo. A partir desse homogeneizado (diluição 1:10), realizou-se a pesquisa de *Salmonella*, segundo recomendações da "International Dairy Federation" (11), empregando-se as etapas de pré-enriquecimento em água peptonada, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas de incubação; enriquecimento seletivo em caldo tetracionato, a 42°C e caldo selenito cistina, a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 e 48 horas; isolamento em meios sólidos seletivos: ágar bismuto sulfito e ágar verde brilhante vermelho de fenol, a 35°C por 24 horas; repique de 6 a 10 colônias típicas de *Salmonella*, de cada meio sólido seletivo, em meio diferencial de ágar tríplice açúcar-ferro, a 35°C por 24 horas. Em seguida, as culturas típicas foram submetidas a caracterização bioquímica pelos teste: H₂S, urease, descarboxilação da lisina, Voges-Proskauer, beta - galactosidase e indol e confirmação sorológico com antissoro polivalente flagelar e somático de *Salmonella*. Neste homogeneizado quantificou-se, ainda, a população bacteriana total (UFC/g) bem como a de coliformes, (NMP/g), conforme metodologia do "Standard methods for the examination of dairy products" (14).

As avaliações físicas e químicas constaram das seguintes análises: umidade, gordura e pH (14). Estas análises foram realizadas apenas no primeiro dia de maturação, exceto o pH que foi avaliado também, aos 15, 30, 45 e 60 dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes a pesquisa de *Salmonella* nos queijos Minas Padronizado, durante a maturação, estão apresentados na tabela 2. Observa-se que as salmonelas foram eliminadas entre 30-45 dias de maturação independente dos tratamentos com H₂O₂. Isso sugere que as concentrações de 200 e 500 mg/l de H₂O₂ não foram eficientes na destruição das salmonelas inoculadas no leite destinado a elaboração dos queijos. Esse resultado era esperado, uma vez que esse grupo de bactérias não é afetado por tais concentrações, a 32°C (2,8). No entanto, o tratamento do leite cru com esse agente antimicrobiano, teve como objetivo a redução ou até mesmo a eliminação de microorganismos produtores de gás, tais como os coliformes, prevenindo-se, dessa forma, o estufamento precoce dos queijos, o qual impediria a maturação, inviabilizando o estudo do efeito desta sobre *Salmonella*.

Tabela 2 — Confirmação da presença ou ausência de *Salmonella* em queijo Minas Padronizado durante maturação à temperatura ambiente.

Queijos	Dias de maturação	<i>Salmonella</i> sp
Queijo de leite pasteurizado	01	Ausente
	15	Ausente
	30	Ausente
	45	Ausente
	60	Ausente
Queijo de leite cru	01	Presente
	15	Presente
	30	Presente
	45	Ausente
	60	Ausente
Queijo de leite tratado com 200mg/l H ₂ O ₂	01	Presente
	15	Presente
	30	Presente
	45	Ausente
	60	Ausente
Queijo de leite tratado com 500 mg/l H ₂ O ₂	01	Presente
	15	Presente
	30	Presente
	45	Ausente
	60	Ausente

O período de sobrevivência das salmonelas nos queijos Minas Padronizado pode ser considerado curto quando comparado com o de outras variedades de queijos como Cheddar, Greek, Brynza (10, 18, 24). Campbell e Gibbara (4) detectaram a presença de *S. typhi* em queijo Cheddar, por um período de 3 meses, quando armazenado a 15°C . Esse menor

período de sobrevivência das salmonelas nessa variedade de queijo, pode ser atribuída ao tipo e qualidade da cultura láctica utilizada, à temperatura de maturação e à transformações bioquímicas que ocorrem durante a maturação do produto.

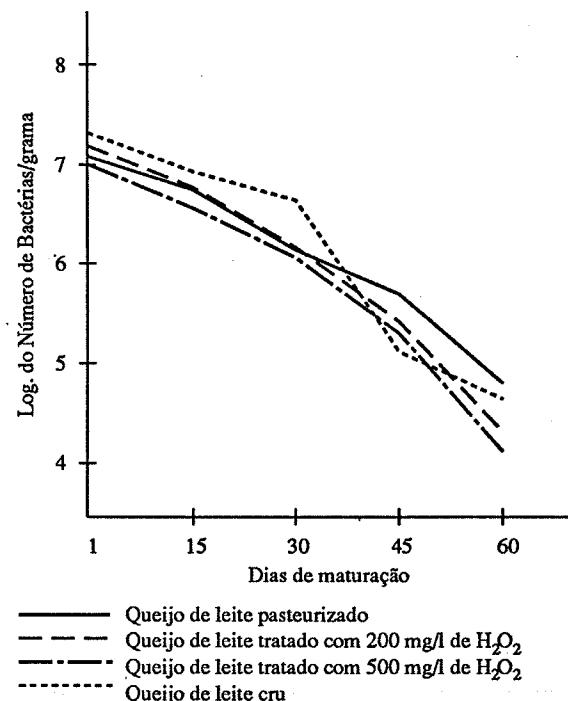
A cultura láctica utilizada na elaboração dos queijos apresentou 63°D de acidez. Essa ótima atividade acidificante, favoreceu a produção de ácido lático, o qual conferiu alta acidez aos queijos. Nestes, no primeiro dia de maturação, os valores de pH variaram entre 4,65 e 4,69. A partir daí, esses valores aumentaram gradualmente, chegando aos 60 dias de maturação dos queijos entre 5,52 e 5,60. Várias pesquisas têm revelado que a cultura láctica inibe efetivamente, patógenos como *Salmonella* em queijos em decorrência da produção de ácido lático que reduz o pH e, consequentemente, aumenta a acidez, além da produção de outros metabólitos antimicrobianos como o H₂O₂ e antibióticos (17, 21, 23).

Os queijos foram maturados à temperatura ambiente, aproximadamente 25°C. Essa temperatura pode ser considerada alta em relação às empregadas na maturação de outras variedades de queijos, que de maneira geral, varia entre 4 a 16°C. Alguns autores (4, 10) revelaram que o tempo de sobrevivência de *Salmonella* em queijos é inversamente proporcional a temperatura de maturação. Goepfert *et al.* (10) detectaram a presença de *S. typhimurium* em queijos Cheddar por um período de 3 meses quando maturados a 13°C e 4 meses nos maturados a 7°C. O mesmo comportamento foi observado com *S. typhi* também em queijos Cheddar, onde esta permaneceu viável por 3 meses nos queijos maturados a 15°C e durante 10 meses nos maturados a 5°C (4). Essa maior viabilidade de *Salmonella* em queijos maturados a temperaturas mais baixas é atribuída à capacidade dessas bactérias tolerarem tais temperaturas por período relativamente longo (7, 15) e a menor atividade dos microrganismos lácticos.

Durante a maturação dos queijos além das enzimas que decompõem a lactose, principalmente, em ácido lático, as bactérias lácticas produzem proteases e lipases, as quais hidrolizam as proteínas à peptonas, polipeptideos, aminoácidos, entre outros, e as gorduras a ácidos graxos. Segundo Chapman & Sharp (6), essas transformações bioquímicas tornam o queijo um meio adverso a sobrevivência de microrganismos patogênicos.

Os resultados referentes à contagem de população de bactérias mesófilas presentes nos queijos, durante o período de maturação, estão apresentados na figura 1. Observa-se uma redução média, de $7,0 \times 10^7$ a $4,4 \times 10^4$ UFC/g, do primeiro ao sexagésimo dia de maturação. Essa redução foi gradual e as

Figura 1 — Variação da população bacteriana total dos queijos durante a manutenção à temperatura ambiente.



variações populacionais entre os diferentes tipos de queijos, em cada intervalo de tempo, não foram significativas a nível de 5%, pelo teste de Tukey, indicando que a destruição dos microorganismos não variou com o tipo de queijo e sim com o período de maturação. Por outro lado, a redução da população de coliformes variou em função de tipo de queijo, ou seja, conforme o tratamento dado à matéria-prima. Os queijos obtidos de leite cru, isto é, sem tratamento algum, apresentaram maior número de coliformes, 350 NMP/g, no primeiro dia de maturação, os quais foram reduzidos a 5 no décimo quinto dia e não foram mais detectados aos 30 dias. O tratamento do leite cru com 500 mg/l de H₂O₂ resultou num produto com apenas 5 NMP/g, no primeiro dia de maturação, isso representou uma redução de 98% da população de coliformes em relação aos queijos obtidos a partir de leite cru. A concentração de 200 mg/l de H₂O₂ também exerceu grande efeito bactericida sobre os coliformes reduzindo-os a 25 NMP/g, aos 15 dias de maturação. A presença de coliformes não foi mais detectada, aos 15 dias de maturação, nos queijos obtidos a partir de leite tratado com H₂O₂. O número de coliformes, presente nesses queijos, está dentro dos limites permitidos pela Divisão Nacio-

nal de Vigilância Sanitária de Alimentos (3). Em estudos realizados por Velloso (25) também foi constatada acentuada redução de população de coliformes, em queijo Minas Padronizado obtido de leite tratado com 200 mg/l de H₂O₂, a 37°C, por 30 min e redução total, a 50°C, por igual período de tratamento.

O teor médio de gordura dos queijos, no primeiro dia de maturação, variou entre 28%, nos queijos de leite pasteurizado (controle), e 32% nos leite cru integral. O menor teor de gordura dos queijos de leite pasteurizado é função da gordura desse leite ser padronizada em 3,2%. O fato dos três tipos de queijos obtidos de leite cru integral terem apresentado igual teor de gordura, sugere que esse componente não foi afetado pelos tratamentos com H₂O₂. Outros autores (8, 13, 22) também observaram que o H₂O₂ não exerce influência sobre a gordura láctea.

A porcentagem média de umidade dos queijos, no início da maturação, variou entre 37%, nos queijos de leite cru, e 43%, nos de leite tratado com 500 mg/l de H₂O₂. Os queijos de leite pasteurizado e de leite tratado com 200 mg/l de H₂O₂ apresentaram 38 e 39% de umidade, respectivamente. A variação no teor de umidade dos queijos de leite tratado com 500 mg/l de H₂O₂ foi significativa a nível de 5%, pelo teste de Tukey. Acredita-se que a maior umidade dos queijos de leite tratado com H₂O₂ seja devida a formação de água durante a decomposição desse agente germicida. Maior teor de umidade em queijos elaborados a partir de leite tratado previamente com H₂O₂, também foi constatado por outros pesquisadores (12, 22, 25).

Os queijos não foram avaliados sensorialmente, durante o período de maturação, em virtude da inoculação com *Salmonella*; no entanto, pode-se observar que aqueles com 500 mg/l de H₂O₂ apresentavam-se mais úmidos e com defeitos de corpo e textura. Segundo Roundy (20) e Kosikowski (12) queijos com umidade elevada, em adiantado estágio de maturação, apresentam sabor amargo e maior maciez. Essas características sensoriais, também foram observadas em queijos Minas Padronizado fabricados com leite tratado previamente com 400 e 600 mg/l de H₂O₂ e maturados a 12°C (25).

SUMMARY

Survival of *Salmonella* in standard Minas cheese during maturation

The survival of a mixed population of *Salmonella typhi*, *S. typhimurium* and *S. dublin* in

Standard Minas cheeses during maturation was followed. The *Salmonella* mixture was inoculated into the raw milk before chesse formation. Four types of cheese were formed a) from pasteurised milk (control), b) from raw milk, c) from raw milk treated with 200 mg/l of hydrogen peroxide (H₂O₂) and d) from raw milk treated with 500 mg/l of H₂O₂. The formed cheeses were matured at room temperatures ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) for a period of 60 days. During this period, at intervals of 15 days, all were evaluated for the presence or absence of *Salmonella*, on standard plate counts (CFU/g), for total coliforms (MPN/g) and for pH. On the first day of maturation fat and water contents were also determined. The *Salmonella* survived for 30 - 45 days of the maturation period, independently of the H₂O₂ treatments. This suggests that the biochemical transformations that occurred during this time turned the cheeses into an unfavourable medium for the survival of this group of pathogenic bacteria. The population count of mesophilic bacteria fell gradually, from 7.0×10^7 to 4.4×10^4 CFU/g, during the course of maturation. The treatments of raw milk with 200 and 500 mg/l of H₂O₂ were effective in the destruction of gas producing microorganisms of the coliform group, preventing the precocious swelling of the maturing cheeses. The fat content of the cheeses was not affected by these H₂O₂ treatments but, on the other hand, they significantly increased their water content. The lactic culture used in the elaboration of the cheeses displayed good quality and conferred on them high acidity. On the first day of maturation pH values varied between 4.65 and 4.69. From then onward these values increased gradually, reaching between, 5.52 and 5.60 after 60 days.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Becker, H & Terplan, C. *Salmonella* in milk and milk products. Review. *J. Veterinary Medicine*, B 33:1-25, 1986.
- Borges, M. F. de; Brandão, S.C.C. & Pinheiro, A. J. R. Efeito bactericida do peróxido de hidrogênio sobre *Salmonella* em leite destinado a fabricação de queijos. *Rev. Microbiol.*; 20(2): 145-149, 1989.
- Brasil. Ministério da Saúde. Divisão Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 001, de 28/01/87. Brasília, 1987. 20p.
- Campbell, A. G. & Gibbara, J. The survival of *S. typhosa* in cheddar cheese manufactured from infected raw milk. *Can. J. Public. Health*, 35:158-164, 1944.
- Chalker, E. B. & Blaser, M. J. A review of human salmonellosis: Magnitude of *Salmonella* infection in the United States. *Rev. Infect. Dis.*, 10:111-124, 1988.
- Chapman, H. R. & Sharp, M. E. Microbiology of Cheese. In: *Dairy Microbiology*. London, Robinson

7. Applied Sci. Publishers, 1981. v.2. p.1-157.
7. Coelho, M. S. L. *Sobrevivência de Salmonella em carne bovina moída, refrigerada e congelada*. Viçosa, U. F. V., Impresa Universitária, 1982. 37p. (Tese - M.S.).
8. Cook, D. J. Hydrogen peroxide and world's dairy. *The Milk Industry*, 53:37-41, 1963.
9. Ferreira, M. D.; Pinto, V. L. L. T. & Hofer, E. Manipuladores de alimentos em restaurantes de Belo Horizonte, portadores de *Salmonella*. *Rev. Microbiol.*, 15:54-59, 1984.
10. Geopfert, J. M.; Olson, N. F. & Marth, E. H. Behaviour of *Salmonella typhimurium* during manufacture and curing of Cheddar cheese. *Applied. Microbiol.*, 16:862-866, 1968.
11. International Dairy Federation. *Milk and milk products detection of Salmonella*, Brussels, 1960. 8p. (IDF Standard, 93).
12. Kosikowski, F. V. Cheese and fermented milk foods. 2 ed., Ann Arbor, Michigan, Edwards Brothers, 1977. 711p.
13. Luck, H. The use of hydrogen peroxide in dairy products. In: *Milk Hygiene*. Geneva, FAO/OMS, 1962. 805p.
14. Marth, E. H. *Standard methods for the examination of dairy products*. 14 ed. Washington, APHA, 1978. 416p.
15. Minor, L. L. The genus *Salmonella*. In: Mortimer, P. S. et alii (eds.) *The prokaryotes: a handbook on habitats, and identification of bacteria*. Berlin, Heidberg Springer-Verlag, 1981. p.1148-1159.
16. Mocquot, G.; Lafont, P. & Vassal, L. Further observations on the survival of *Salmonella* in cheese. *Ann. Inst. Pasteur*, 140: 570-576, 1963.
17. Park, H. S. & Marth, E.H. Behaviour of *Salmonella typhimurium* in skimilk during fermentation by lactic acid bacteria. *J. Milk Food Technol.* 482-488, 1972.
18. Park, H. S. & Marth, E. H.; Goepfert, J. M. & Olson, N. F. The fate of *Salmonella typhimurium* in the manufacture and ripening of low-acid Cheddar cheese. *J. Milk Food Technol.*, 33:280-284, 1970.
19. Ribeiro, J. A. *Fabricação de queijos*. 2 ed. Rio de Janeiro, Serviço de Informação Agrícola, 1961. 73p.
20. Round, Z. D. Treatment of milk for cheese with hydrogen peroxide. *J. Dairy Sci.*, 41:1460-1465, 1958.
21. Santos, N. S. Isolamento e caracterização de *Lactobacillus acidophilus* de fases de crianças alimentadas ao seio e de bezerros, visando a sua utilização como adjuunto dietético. Viçosa, U.F.V., Impresa Universitária, 1984. 69p. (Tese - M.S.).
22. Sokolova, A. G.; Maistruk, P. N.; Solomko, G. L.; Prudnikova, L. V.; Hygiene evaluation of peroxidase-catalase treatment of milk in the manufacture of hard cheese. *Mezhdunarodnyi Sbornik*, 19:85-87, 1984.
23. Speck, K. L. Control of food-borne pathogens by starter cultures. *J. Dairy Sci.*, 55:1019-1022, 1972.
24. Tzannetis, S. E. & Papavessilion, J. Survival of the *Salmonella typhimurium* in acid type Greek cheese. *Alimenta*, 14: 87-93, 1975.
25. Velloso, C. R. V. *Ocorrências de brucelas no leite e seu comportamento durante o processamento e cura de queijo Minas Padronizado e Mussarela*. Viçosa, U. F. V., Impresa Universitária, 1985. 124p. (Tese - M.S.).

Recebido para publicação em 23/10/89

PATOGENICIDAD DE CEPAS DE *MICROSPORUM FULVUM*, AISLADAS DE SUELOS TRATADOS CON HERBICIDAS*

Delia P. Alvarez
Y Alicia G. Luque

RESUMEM

Cepas de *Microsporum fulvum*, que se aislaron de suelos cultivables, sin tratamiento desmalezante y con la aplicación de los herbicidas, Metribuzín, Atrazina y Alachlor, fueron estudiadas con el fin de conocer, si la acción fitotóxica de tales agroquímicos, modificó la capacidad infectante de las mismas. Para ello se inocularon cuatro lotes de cobayos, con un homogeneizado en gel de agar de parte del desarrollo de esas cepas en sabouraud-glucosa. La inoculación se practicó en la zona de los flancos, previo rasurado y escarificación. De acuerdo a la sintomatología de las lesiones provocadas, las cepas de *M. fulvum* obtenida de suelos con Atrazina, produjo una marcada reacción ulcerante, con prolongada alopecia en la zona de inoculación. A su vez se determinó la capacidad queratinolítica de tal desarrollo, practicado en un medio líquido que contiene como fuente nitrogenada un triturado de astas de vacunos y pelos de caballo, con incubación a 28°C, durante 60 días. En alícuotas de 10 ml que se tomaron de esos cultivos, y los correspondientes testigos, fue valorada la actividad queratinolítica, como así también los compuestos azufriados resultantes de la misma. Para la primera determinación se usó como sustrato cortes de pelos de cobayos blancos, en medio líquido, determinándose el contenido de proteínas espectrofotométricamente a 280 nm. En base a la acción reductora de los radicales sulfhidrilos de la cisteína y S-sulfocisteína sobre el ácido fosfatúngstico, fueron valorados los compuestos sulfhidrilados, productos de la queratinolisis. Los datos del ensayo enzimático de la cepa aislada de suelos tratados con Atrazina, mostraron valores significativamente superiores a los obtenidos para los controles. Esas determinaciones se corresponden con la más alta concentración de los compuestos sulfhidrilados resultantes. Este comportamiento nos lleva a considerar a esos cultivos de *M. fulvum* como una mutante bioquímica con manifestación de un fenotipo virulento, originado por los cambios ambientales producidos al incorporarse a los suelos un biocida vegetal como Atrazina.

Palabras clave: suelos, herbicidas, hongo queratinolítico, *Microsporum fulvum*, patogenicidad - actividad queratinolítica.

INTRODUCCION

En trabajos anteriores, hemos estudiado, las alteraciones que los herbicidas preemergentes: Atrazina, Metribuzín y Alachlor, producen sobre los

procesos de germinación, crecimiento (2), queratinolisis (3), y utilización de nutrientes(1), en un grupo de cepas fúngicas que constituye la población microbiana queratinolítica de los suelos y que a la vez son potencialmente patógenas para el

Departamento de Microbiología (Área Micología). Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario. Suipacha 531. Rosario (2000). Santa Fe. República Argentina.

hombre y los animales, reconociéndoselas, en ese caso, como dermatofitos.

Los resultados obtenidos, de tales estudios motivaron el interés por observar el comportamiento de esas cepas en cuanto a su capacidad infectante al ser inoculadas en animales de laboratorio. Para ello se desarrolló un plan de experiencias empleando colonias de *Microsporum fulvum*, las más frecuentemente obtenidas de la siembra de suelos con y sin aplicación de los herbicidas antes mencionados.

En trabajos de Weitzman y col. (12), Gordon y col. (5), se comparó la patogenicidad del desarrollo teleomórfico de *M. Fulvum*, *Nannizzia fulva*, con otras formas sexuadas del complejo *M. gypseum* y obtuvieron que *Nannizzia incurvata* y *Nannizzia gypsea* eran más infectantes que *N. Fulva*, tanto en conejos como en cobayos. Asimismo en los casos en que se ha efectuado la identificación genética de las cepas de ese complejo, aisladas de infección humana, muestra a *N. fulva* como la menos virulenta.

En este aspecto estudiosos de Weigl (11) con mutantes de *M. gypseum*, determina que la manifestación de virulencia puede estar significativamente influenciada por cambios en la información genética, ligados a variaciones morfológicas y bioquímicas, de tal manera, que si estas se hacen reversibles, puede modificarse el grado de patogenicidad. El rango de esas variaciones puede ser amplio como sus manifestaciones fenotípicas, teniendo en cuenta no solo el agente, sino las condiciones de su interrelación con el huésped.

Poder observar la capacidad infectante de las cepas de *M. fulvum*, que muestran un efecto selectivo y de adaptación a los cambios que acompañan a los tratamientos herbicidas, de uso corriente en suelos agrícolas, constituye el objetivo de este estudio.

MATERIAL Y METODO

Las cepas de *M. fulvum* aisladas por la técnica del anzuelo queratinoso de parcelas correspondientes a suelos sin tratamiento desmalezante; Cepa nº 1; con aplicación de Alachlor; Cepa nº 2; Metribuzín, Cepa nº 3 y Atrazina, Cepa nº 4, a los cuarenta días de la utilización de esos herbicidas. Alvarez y col. (1). A partir del desarrollo de las mismas con 15 días de incubación a 28°C en medio de agar sabouraud glucosa, se preparó el material a inocularse; para ello, secciones de la capa micelial, equivalente a 1 cm² de su superficie, fueron homogeneizadas en gel de agar. Tal homogeneizado

se aplicó en un lote de cobayos, entre 300 y 400 g de peso, previo rasurado y escarificación de un sector de los flancos, con límite circular y de aproximadamente 2 cm de diámetro.

Se controló diariamente la dermatofitosis así provocada, con el registro de la sintomatología correspondiente y al observarse la misma, se practicó la extracción de material de piel de la zona afectada para su estudio micológico, en base a exámenes microscópicos de ese material, con KOH 20% y colorante Gueguén; cultivos en agar sabouraud glucosa, agar sabouraud cloromicetina, lactrimel, para obtener el aislamiento y realizar las observaciones macro y micromorfológicas de las cepas de prueba. Tales estudios se repitieron semanalmente, hasta remisión total de la lesión.

A la Cepa nº 4 obtenida de suelos con Atrazina, y que mostrara mayor virulencia, fue determinada su actividad queratinolítica y la concentración de los compuestos sulfhidrilados solubles que se liberaron en el medio de cultivo, durante la queratolisis, haciéndolo comparativamente a la Cepa nº 1, aislada de la parcela sin herbicida.

Con cultivos de ambas cepas en agar sabouraud glucosa y a los 15 días de desarrollo a 28°C, se preparó utilizando agua destilada estéril y con agitación en el Vortex, una suspensión de 1 x 10⁸ macroconidios, por contajes en cámara de Neubauer. Tal inóculo fue sembrado por triplicado en 150 ml del medio de sales y queratinas, compuesto de Mg SO₄ · 7 H₂O; 5 g, KH₂PO₄: 0,5 g, K₂HPO₄; 0,5 g, thiamina · HCl: 100 µg, triturado de astas de vacunos y pelos de caballo: 2,5 g, para 1.000 ml de agua destilada. Durante sesenta días, se incubaron los cultivos a 28°C, manteniéndose constante el volumen del medio.

A intervalos de 7, 15, 30, y 60 días se separaron 10 ml de tales cultivos, y previa centrifugación en frío, 15.000 r.p.m. a 4°C, 15 minutos y filtrado en Millipore: 0,45 µ se procedió a valorar en esa muestra la actividad queratinolítica y los compuestos azufrados resultantes de la misma.

Para la primera determinación se siguió la técnica de Takiuchi y col. (10). El sustrato para ese ensayo enzimático, se preparó con cortes de pelos de cobayos blancos de 1-2 mm, desengrasados con metanol-cloroformo al 50%; luego de sucesivos lavados con agua y una vez secos al aire, se esterilizaron con óxido de etileno, dos horas. 50 mg de ese sustrato queratinoso fue agregado a 2 ml del filtrado diluido con 4 ml de un buffer de fosfatos 28 mM a pH 7,8. La mezcla fue mantenida durante 4 horas en un baño de 37°C. Despues de ese tiempo y previo filtrado fue valorado el contenido proteico

espectrofotométricamente a 280 nm. Como control, igual volumen del filtrado, se llevó a ebullición, previo al ensayo, además del testigo, con el sustrato queratinoso en el buffer de fosfatos.

Un incremento de 0,100 de la absorbancia fue equivalente a una unidad de queratinasas: UK y la actividad específica se expresó como UK por mg de proteína. El contenido de la misma fue determinado por Merckotest para proteínas de Diagnóstica Merck.

Para la valoración de los compuestos sulfhidrilados, se utilizó la técnica de Shinohara y Padis (9), basada en la acción reductora de los radicales sulfhidrilos, de la cisteína, S-sulfocisteína, sobre el ácido fosfotungstico. Las lecturas se hicieron en un espectrofotómetro a 600 nm, y dadas un µg de cisteína, de acuerdo a una curva de calibración previamente efectuada.

RESULTADOS

Los signos registrados, durante la evolución de las lesiones provocadas experimentalmente, están indicadas en la Tabla nº 1.

De acuerdo con ellos, la Cepa nº 1 de *M. Fulvum*, aislada de suelos sin tratamiento herbicida, provocó escasa reacción en los cobayos inoculados ya que al cabo de dos semanas, no se observa reacción alguna, y en menor grado la Cepa nº 2, que se muestra muy poco virulenta. Por el contrario, las infecciones producidas por las Cepas nº 3 y nº 4, provenientes de suelos con Metribuzín y Atrazina, manifestaron una marcada reacción tisular, sobre todo por el último inoculante con respuesta inflamatoria exudativa, y posterior necrosis, que determinó la formación de una placa alopecia, observada hasta los 45 días del control de los animales.

Las primeras reacciones en la zona inoculada con material de las Cepas nº 1 y nº 2, comenzaron a observarse a los 7 días de provocada la lesión, lo que no ocurrió con las Cepas nº 3 y nº 4, que más tarde, a los 15 días, iniciaron una acción sobre el huésped, mucho más agresiva.

En los exámenes micológicos practicados, pudo observarse, tanto en las escamas, como en los pelos extraídos, formas filamentosas y de arthroconidas, predominando éstas últimas, en el material extraído de las lesiones más inflamatorias, como índice del tipo de interrelación con el huésped. Tales observaciones se negativizaron entre 7 y 10 días anteriores a la curación de la zona afectada; de igual modo los cultivos en medios de agar sabouraud glucosa y lactrimel. El estudio macro y mix-

Tabla 1—Características clínicas y micológicas de las lesiones producidas experimentalmente, en un lote de cobayos por cepas de *Microsporum fulvum*.

Cepa nº 1, aislada de suelos sin tratamiento herbicida; con aplicación de Alachlor, Cepa nº 2; Metribuzín, Cepa nº 3, y Atrazina, Cepa nº 4.

	Cepa nº 1	Cepa nº 2	Cepa nº 3	Cepa nº 4
Período de iniciación de las lesiones (en días)	7	7	15	15
Eritema	-	-	+	+
Descamación	+	±	++	+
Formación de escamocostas	-	-	+	++
Inflamación	-	-	+	+++
Ulceración	-	-	-	+++
Alopecia	-	-	-	+
Diseminación	-	-	-	-
Elementos fúngicos en escamas	+	-	+	+
Elementos fúngicos en pelos	+	-	++	++
Cultivos	+	-	+	+
Curación (en días)	15	10	30	60

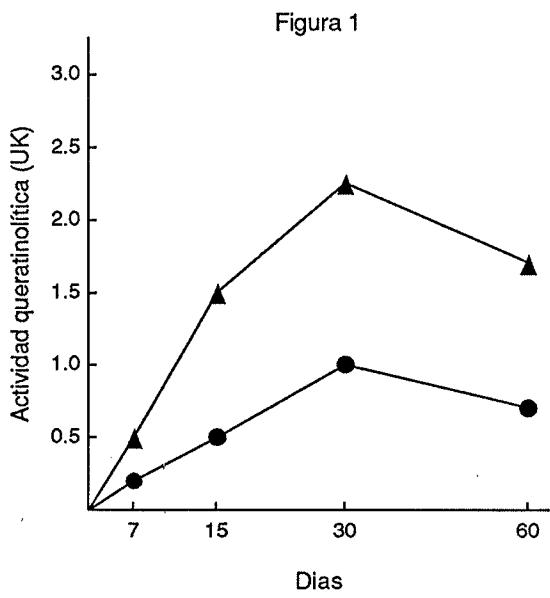
cromorfológico de esos desarrollos, no mostraron diferencias con el crecimiento primario. Ninguno de los animales presentó diseminación de las lesiones en otra región además de la inoculada.

En cuanto a la valoración de la actividad queratinolítica, los datos obtenidos, al relacionar actividad específica (las unidades de queratinasas por mg de proteína), y los tiempos del dosaje, como lo muestra la Figura 1, son significativamente mayores para la Cepa nº 4, comparándolos con los correspondientes a la Cepa nº 1, en todos los intervalos del seguimiento, alcanzando un valor máximo a los 30 días de iniciado el ensayo.

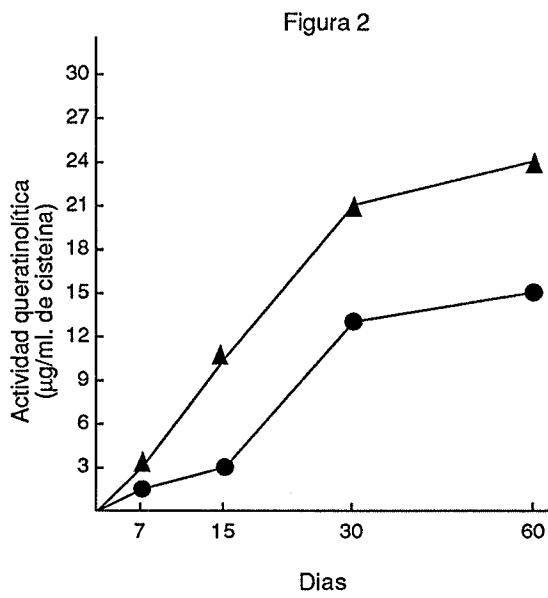
Estas determinaciones se corresponden con la más alta concentración de los compuestos sulfhidrilados, resultantes de la actividad queratinolítica correspondiente a la Cepa nº 4 en relación con la Cepa nº 1, tal como lo muestra la Figura 2.

DISCUSION

Las cepas de *M. fulvum* estudiadas mostraron



UK: Unidades de queratinasa por mg. de proteína
 ▲ : Cepa n°2: aislada de suelos sin Herbicida
 ● : Cepa n°1: aislada de suelos con Atrazina



▲ : Cepa n°2: aislada de suelos sin Herbicida
 ● : Cepa n°1: aislada de suelos con Atrazina

Figura 1 y Figura 2 — Datos promedio de tres determinaciones de la actividad queratinolítica (Figura 1) y de los compuestos sulfidrilados resultantes, equivalentes a cisteína (Figura 2), en cepas de *Microsporum fulvum* aisladas de suelos sin tratamiento herbicida y con aplicación de Atrazina.

al inocularse experimentalmente en cobayos, un rango de patogenicidad variables de acuerdo a la procedencia de tales aislamientos. El tipo de respuesta observada, se correspondió con el gradiente de proteasas queratinolíticas producidas por los dos desarrollos que mostraron escasa y muy marcada reacción tisular, respectivamente. Tal actividad enzimática reviste especial importancia, no solo para la penetración en el tegumento del huésped, sino también en la capacidad invasiva a través del mismo, tal como lo demuestran, los trabajos de Grappel y col. (6), Gordon y col. (5), Minocha y col. (7).

Si bien se han mencionado estudios con animales de laboratorio, sobre patogenicidad de la forma sexuada de *M. fulvum*, cabe señalar al respecto, que al no identificarse teleomórficamente todas las cepas de *M. gypseum*, aisladas de lesiones tanto en el hombre como en los animales, se carece de datos, sobre el real poder infectante de las tres especies que componen el llamado *M. gypseum*. Asimismo, estudios de Punsola y Guarro (8) refieren una particular distribución de los desarrollos sexualmente compatibles de esas especies, de acuerdo a características geográficas y de los suelos

que constituyem su reservorio.

En nuestra experiencia, las cepas empleadas, a excepción de la que se obtuvo de parcelas sin tratamiento herbicida, han recibido la acción de tales compuestos, los que además de un efecto selectivo, pudieron provocar en la especie estudiada, mutantes bioquímicas, que como se señalara, inciden en los factores de patogenicidad, a nivel enzimático, inmunológico, danto fenotipos con un diferente rango de virulencia, de acuerdo a los cambios ambientales producidos, los que en este caso, se pudieron dar al incorporarse a los suelos biocidas vegetales como Atrazina, Metribuzín y Alachlor.

SUMMARY

Pathogenicity of *Microsporum fulvum* isolated from soil treated with herbicides.

Strains of *Microsporum fulvum*, isolated from agricultural soils which had no herbicides treatment and had herbicides applied — Metribuzin, Atrazina, Alcahlor — were studied to know if the fit-

otoxic action of such agrochemicals modified the infectant capacity of them. Four lots of guinea pigs were inoculated with a homogenized agar gel from part of the development of those strains growth os Sabouraud-glucose. The inoculation was carried on in flanks after sheared and scarification.

According to the symptoms of the provoked lesions, the *M. fulvum* strains obtained from soils with Atrazina produced a stressed ulcerating reaction with a prolonged alopecia in the area of inoculation. Also, at the same time, the keratinolytic capacity of the development in a liquid medium with nitrogenous supplement a triturated cow's horn and horse-hairs, with inoculation at 28°C for 60 days, was determined.

The keratinolytic activity was evaluated in aliquots of 10 ml taken from those cultures and the sulphured compounds as a result of this activity were also valued.

For the first determination, sustrates of cuts of hairs of white guinea pigs in liquid medium were used; the content of proteins was determined spectrophotometrically. The compounds sulphidrylated, products of keratinolysis, were analysed based on the reducting action of the radical sulphidryles of the cysteine and S-sulphocysteine on the phosphotunstic acid.

The data of the enzymatic assay of the isolated strain of soils treated with Atrazina showed amounts significantly higher to those obtained for control. These determinations are related to the highest concentration os the resultant sylphidrylated compounds.

This behavior makes us think that those cultures of *M. fulvum* are a biochemical mutant with manifestation of a virulent fenotype originated by the environmental changes produced when incorporated to the soils a herbicide as Atrazina.

Key words: soils — herbicides — keratinolytic fungi — *Microsporum fulvum* pathogenicity — keratinolytic activity.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alvarez, D. P.; Luque, A. G. & Marini, P. Influencia de herbicidas sobre la micota queratinolítica de los suelos. *Boletín Micológico*, 3, (1): 81-85, 1986.
2. Alvarez, D. P.; Luque, A. G. & Marini, P. & Gamberale, M. E. Influencia de herbibidas preemergentes sobre el desarrollo de dermatofitos geófilicos en suelos agrícolas. *Boletín Micológico*, 3, (4): 275-281, 1988.
3. Alvarez, D. P.; Luque, A. G. & Marini, P. & Gamberale, M. E. Queratinolisis por *Microsporum fulvum* Uriburu. *Boletín Micológico*, 3, (4): 253-257, 1988.
4. Collins, J. P.; Grappel, S. F. & Blank, F. F. Role of keratinases in dermatophytosis II. Fluorescent antibody studies with keratinase II of *Trichophyton mentagrophytes*. *Dermatologica*, 146: 95-100, 1973.
5. Gordon, M. A.; Perrin, V. & Little, G. N. Differences in pathogenicity between *Microsporum gypseum* and *Microsporum fulvum*. *Sabouraudia*, 5: 366-370, 1967.
6. Grappel, S. F. Role of keratinases in dermatophytosis. Reactivities of sera from guinea pig with heat-inactivated keratinase II. *Dermatologica*, 153: 157-162, 1976.
7. Minocha, Y.; Parsicha, J. S.; Mohapatra, L. R. & Kandhari, K. C. Proteolitic activity of dermatophytes and its role in the pathogenesis of skin lesions. *Sabouraudia*, 10: 79-85, 1972.
8. Punsola, L. & Guarro, J. Distribution of mating types of the "Microsporum gypseum complex" in spanish soils. *Mykosen*, 27 (4): 191-193, 1983.
9. Shinohara & Padis. *Química Clínica*; Henry, R. J. Ed. Jims. Barcelona, 366-370, 1968.
10. Takiuchi, I.; Higuchi, D.; Sei, Y & Koga, M. Isolations of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporum canis*. *Sabouraudia*, 20: 281-288, 1982.
11. Weigl, E. Conditioned pathogenicity of *Microsporum gypseum* biochemical mutants. *Mycopathologia*, 70, (1): 3-8, 1980.
12. Weitzman, I.; Silva-Hutver, M. & Kozma, I. A comparison of the pathogenicity of three members of the *Microsporum gypseum* complex. *Sabouraudia*, 5: 360-365, 1967.

Recebido para publicação em 21/10/89

SPHAEROPLAST FORMATION PROCESS IN THE FUNGUS *HUMICOLA* SP

Edison Neirotti*
Yoshitaka Tanaka
& João Lúcio de Azevedo

SHORT COMMUNICATION

SUMMARY

Sphaeroplast formation was studied in *Humicola* sp. Samples were collected at 30 minutes intervals and obtained the number of sphaeroplasts/ml, number of nuclei/cell and regeneration frequencies. These frequencies decreased but the number of sphaeroplasts/ml and nuclei/sphaeroplasts increased with the increase of treatment times.

Key words: *Humicola*, sphaeroplast formation, cellulolytic fungi

Humicola sp. is a good cellulase producing fungus. However it has no known sexual stage and presents multinucleated conidia which makes this fungus not suitable for mutant induction and further genetic studies. In this way, the production and fusion of sphaeroplasts seems to be an alternative method for genetic studies and breeding of this fungus. In the present study, sphaeroplast after different enzymatic treatment times (30 until 180 minutes) were obtained. For each time studied, sphaeroplast production, frequency of regeneration and nuclei number per sphaeroplast were estimated as well the location of sphaeroplast emergence from the fungus hyphae.

The microorganism used was *Humicola* sp., a filamentous fungus isolated from compost (1).

Culture media was solid and liquid complete media (CM) (9).

Sphaeroplasts were obtained by the method of Peberdy (6) with the modifications proposed by Macedo (3). They were produced by enzymatic hydrolysis of the mycelial suspension with Novozym 234 (Novo Biolabs, Denmark) and Cellulase CP (Sturge's) using MgSO₄ 0.5 M as osmotic stabilizer (5). Sphaeroplast were harvested at intervals

of 30 minutes till 180 minutes of enzymatic treatment.

For regeneration sphaeroplasts were suspended in molten (45°) CM with MgSO₄ 0.5 M. Petri dishes were incubated at 28°C during 24 hours and then transferred to 42°C (5).

The nuclei were stained by HC1-Giemsa method. This technique stains sphaeroplast nuclei and permitted to count their number per cell. The diameter of sphaeroplast formed after 30 and 180 minutes of enzymatic treatment were quantitatively analized. A completely random design was used, according to Steel and Torrie (10).

In coincidence with the results of De Vries and Wessels (2) in *Schizophyllum comune*, also in *Humicola* sp. abundant vacuolated sphaeroplasts and fragmented mycelium were observed after 30 minutes of the enzymatic treatment using MgSO₄ as osmotic stabilizer. With enzymatic treatment for 60, 120 and 180 minutes, well vacuolated sphaeroplasts without mycelium fragments were observed in the suspensions.

In *Aspergillus nidulans* protoplasts were found after 30-60 minutes of enzymatic treatment (7); on the other hand in *Trichoderma reesei* (8) protoplast

* Instituto de Genética, ESALQ/Univ. São Paulo Caixa Postal 83, 13400 Piracicaba - SP Brasil

Present address: Depto. Botánica - Sección Microbiología, Facultad de Humanidades Y Ciencias C.P. 11200 Montevideo - Uruguay

were formed only after 90 minutes. In the present study, after 30 minutes treatment, 3.6×10^6 sphaeroplasts/ml were obtained. With longer treatment periods the sphaeroplast number increased until the maximum of 1.9×10^7 /ml (Table 1). The regeneration, in opposition to sphaeroplast formation, reached maximum values (1.26%) after 30 minutes of enzymatic treatment (Table 1) decreasing with longer periods of treatment. The results agree with those of Picataggio et al. (8) who found that sphaeroplast regeneration frequency is inversely proportional to the enzymatic treatment time. It was suggested (4) that cell wall remains, having an important participation in the new cell wall reconstitution and the same suggestion can be also applied in the present work. Table 2 shows the number of nuclei per sphaeroplasts produced after different enzymatic treatment times; highest uninucleated sphaeroplast percentage (75.5%) was found at 30 minutes. The increase of the enzymatic treatment time results in an increase of multinucleated sphaeroplasts.

Table 1 — Sphaeroplast formation and regeneration as a function of time.

Enzymatic treatment time (min.)	Sphaeroplast number/ml	Regeneration (%)	Sphaeroplast diameter (μm)
30	3.6×10^6	1.258	3.095
60	5.6×10^6	1.115	—*
90	1.0×10^7	0.985	—
120	1.4×10^7	0.858	—
150	1.6×10^7	0.922	—
180	1.9×10^7	0.905	3.431

— * = not measured

Table 2 — Number of nuclei in sphaeroplasts of *Humicola* sp. obtained at different times of enzymatic treatment.

Treatment Time (min)	Nuclei number*				Average nuclei		
	1	2	3	4	Total counted	Uninucleated %	number/cell
30	302	87	8	3	400	75.50	1.28
60	318	125	7	2	452	70.35	1.32
120	327	202	21	1	551	59.34	1.44
180	260	172	19	3	454	57.26	1.48

* Sphaeroplasts without nucleus were not considered.

The diameter of the sphaeroplasts formed after 30 minutes and 180 minutes of enzymatic treatment showed significant differences (Tukey 1%) increasing in diameter upon increasing the treatment time. In *A. nidulans* (7) and *T. reesei* (8), af-

ter short enzymatic treatment periods of time that oscillate between 45 and 90 minutes, the sphaeroplasts are only liberated from the tip of the hyphae, being small and non vacuolated. In the present study, with only 30 minutes of enzymatic treatment sphaeroplasts were observed emerging in different regions of the hyphae and not only from the hyphae tips.

The results show that the adequate enzymatic mycelial treatment time for *Humicola* sp. depends on the objectives of the study. In biochemical studies or induction of stable genetic products, a longer enzymatic treatment is preferable because a higher number of protoplasts/ml is obtained. On the other hand, if the objectives are the production of mutants or to stabilize any genetic material, an enzymatic treatment of 30 minutes is more adequate since it produces a higher percentage of uninucleated cells.

The authors are grateful to the CNPq, FAPESP and FINEP by the financial support.

RESUMO

Formação de esferoplastos em *Humicola* sp

A formação de esferoplastos foi estudada em *Humicola* sp. Amostras foram retiradas a cada 30 minutos, e determinado o número de esferoplastos/ml, número de núcleos/célula e freqüências de regeneração. Esta última diminuiu com tempo de tratamento, mas o número de esferoplastos/ml e de núcleos/esferoplasto aumentou com o tempo.

REFERENCES

- Chaves, V. M. G. — Características fisiológicas de um fungo termófilo isolado de compostagem e propriedades de seu complexo celulase. Viçosa. Master Thesis. Universidade Federal de Viçosa, Brasil. 60p., 1982.
- De Vries, O. M. H. & Wessels, J. G. H. — Chemical analysis of cell wall regeneration and reversion of protoplasts from *Schizophyllum comune*. *Arch. Microbiol.*, 102:209-218, 1975.
- Maccko, J. M. B. — Avaliação do comportamento de *Humicola* sp. com vistas ao melhoramento genético para a produção de celulases. Rio de Janeiro. Master Thesis. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil. 90 p., 1986.
- Necas, O. — Cell wall synthesis in yeast protoplasts. *Bacteriol Rev.*, 35:149-170, 1971.
- Neirotti, E. — Produção de celulases e fusão de protoplastos em *Humicola* sp. Piracicaba, Doctoral Thesis.

- ESALQ/USP, Brasil, 168 p., 1988.
- 6. Peberdy, J. F. - Fungal protoplasts: isolation, reversion and fusion. *Ann. Rev. Microbiol.*, 33:21-39, 1979.
 - 7. Peberdy, J. F. & Gibson, R. K. - Regeneration of *Aspergillus nidulans* protoplasts. *J. Gen. Microbiol.*, 69:325-330, 1971.
 - 8. Picataggio, S. K.; Schamhart, D. H. J.; Montencourt, B. S. & Eveleigh, D. E. - Sphaeroplast formation and regeneration in *Trichoderma reesei*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 17:121-128, 1983.
 - 9. Pontecorvo, G.; Roper, J. A.; Hemmons, L.M.; Macdonald, K. D. & Butson, A. W. J. - The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238, 1953.
 - 10. Steel, R. G. D. & Torrie, J. H. - Principles and procedures of statistics. A biometrical approach. McGraw-Hill Book Co., New York, 2nd. ed., 633 p., 1990.

Received for publication in 6/11/89

ADHERENCE OF *BACTEROIDES FRAGILIS* STRAINS TO A PRIMARY CELL CULTURE

Regina M. C. Pilotto Domingues¹
Sérgio Pereira Coutinho²
Maria Candida S. Ferreira¹

SHORT COMMUNICATION

ABSTRACT

The capacity of adherence of *Bacteroides fragilis* strains to several available mammalian cells lines was evaluated. Some of them, recognized as able of agglutinating human erythrocytes, were capable of adhering to a primary cell culture, obtained from guinea pig carcass, but not to the other cells tested. The strain, incapable of hemagglutinating, did not demonstrate any ability of adhering to the cells lines tested.

Key words: *Bacteroides fragilis*, adherence, hemagglutination

Although *Bacteroides fragilis* represents a minor component of the fecal flora, it is one of the most important anaerobic pathogen in intraabdominal infections (Finegold, S. M., Anaerobic bacteria in human disease. Academic Press Inc. N. York, 1977). This suggests the existence of some particular properties that would confer a better protection against the host defenses and consequently a high capacity to invade (*Rev. Infect. Dis.*, 6: 189-199, 1984). Several possible virulence factors have been described (*Rev. Infect. Dis.*, 6: 189-199, 1984; *Infect Immun.* 44: 241-244, 1984; *Infect. Immun.* 19: 1083-1087, 1978; *Infect. Immun.* 57: 745-753, 1989; *J. Clin. Microbiol.* 4: 458-460, 1976), but, until now, the exact pathogenic role of this bacteria is not clear.

The ability to colonize epithelial surfaces has been widely accepted as an important pathogenic mechanism, since this capacity may be considered as a prerequisite to the beginning and to the suc-

cess of a pathological process.

Factors involved in the adherence of *B. fragilis* has been subject of studies by many investigators. Surface components, such as pili (*Infect. Immun.* 43: 189-194, 1984; *FEMS Microbiol. Lett.* 59: 113-118, 1989) and capsule (*Infect Immun.* 19: 1083-1087, 1978; *FEMS Microbiol. Lett.* 25: 229-232, 1984; *J. Med. Microbiol.* 21: 105-107, 1986) have been implicated as mediators of attachment. However, the relation of these structures and adherence is not completely understood, and it is great the controversy about it.

Our purpose in this study was to screen some types of mammalian cells lines for the adhesion of *B. fragilis* in order to develop an *in vitro* model to the investigation of this process.

Five strains of *B. fragilis* isolated from normal intestinal flora (FF6) and different infections (O30M, 20656-2-1, MC2, MC3) in *Bacteroides Bile Esculin Medium* (*J. Clin. Microbiol.*, 7: 448-

1. Depto. de Microbiologia Médica Universidade Federal do Rio de Janeiro
PO BOX 68040, Ilha do Fundão. Rio de Janeiro — RJ, Brasil
2. Depto. de Virologia Instituto Oswaldo Cruz
PO BOX 926. Rio de Janeiro — RJ, Brasil

453, 1978), were used. All the strains were identified according to Holdeman *et al.* (Anaerobe Laboratory Manual 4th ed. Virginia Polytechnic Institute & State University, Blacksburg, VA, 1977) and Tally & Gorbach (Anaerobic bacteriology for clinical laboratories. Tufts University School of Medicine, Boston, Mass. 1979). Two reference strains obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD) — 23745 and 25285 — were also included.

Organisms were grown in Brain Heart Infusion Broth, pre-reduced sterilized anaerobically (Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute State University, Blacksburg, VA, 1977), for 18 hs at 37°C. Following incubation, the bacterial cells were pelleted, by centrifugation, at room temperature, and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) 0,01M pH 7,2 to give a concentration of approximately $3,0 \times 10^{10}$ Colony Forming Unit(CFU)/ml. (suspension used in the hemagglutination and adherence tests).

Erythrocytes from human (blood group A) were collected using sodium citrate as anticoagulant in a concentration of 2,5%, washed 3 times with PBS and resuspended at a final concentration of 1%. They were used within one week after collection.

The hemagglutination tests were performed quantitatively. Fifty microliters of the bacterial suspension were serially diluted twofold in PBS, in a microtiter tray, and 50 µl of the erythrocyte suspension were added to each well. The microtiter tray was gently shaken for 1 min at room temperature and after 60 min of incubation at 4°C, it was read.

The capacity to adhere to mammalian cells lines (Hep-2, Ma104, MDCK, MRC-5) was evaluated. One primary cell culture, obtained from guinea pig carcass (GPC) was also tested. It was prepared as described by Bird *et al.* (Basic Laboratory Techniques in cell culture. CDC, Atlanta, 1981).

The cells, suspended in Dulbecco's medium with 1% of fetal bovine serum, in a concentration of $1,5 \times 10^5$ cells/ml, were placed in the tissue culture plates (Descarplast, 3,5cm). After 48 hs, when a good monolayer could be observed, the medium was removed and the bacterial inoculum, in a dilution of 1:5 in a fresh medium was added. It was, then, incubated for 30 min. at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂ and controlled humidity. After this period, it was washed 3 times with PBS, fixed with absolute methanol (10 min) and stained with crystal violet (5 min). Negative controls were performed without the addition of the microorganisms.

The results of the hemagglutination and adherence tests are summarized in Table 1.

Table 1 — Hemagglutination activity (HA) and adherence capacity (AC) of *Bacteroides fragilis* strains.

Strains	HA	AC	
		Hep-2, Ma104, MDCK, MRC-5	GPC
ATCC 25285, 20656-2-1	16	—	+
ATCC 23745, FF6, 030M	8	—	+
MC2	4	—	+
MC3	0	—	—

GPC - Guinea Pig Carcass

Six out of seven strains (ATCC 23745, ATCC 25285, FF6, 030M, 20656-2-1, MC 2) were capable of agglutinating the human erythrocytes, with range titers of 4 to 16 and were able of adhering to GPC cells, but not to the other cells tested (Hep-2, Ma 104, MDCK, MRC-5). Quantitative methods were not used to evaluate adherence. The binding of the bacteria to the cells was diffuse, and clusters formation was not verified. The strain MC3, which was incapable of hemagglutinating, also did not attach to any cell line tested.

The ability of bacteria to adhere to the surfaces of epithelial cells appears to be an important determinant in the colonization of microbial habitats, specially in locations where mechanical cleansing mechanisms are operative. It is generally recognized that this process plays an essential role in the pathogenesis of several infectious diseases (*Med. Microbiology* 3: 21-62, 1983).

In the last years, an increased interest in the investigation of adherence of several microorganisms, in their natural environment, has been observed (*J. Infect. Dis.*, 143: 325-345, 1981). It is known that the study of the molecular mechanisms involved in the bacteria-cell interactions depends on the establishment of *in vitro* models. Several workers have used tissue culture monolayers and primary isolates of eucaryotic cells for that purpose. In relation to *B. fragilis*, Pruzzo *et al.* (*Infect. Immun.* 43:189-194, 1984) have got results with a human cell line, Intestine 407. As we were not able to achieve this line, we decided to screen another types, available for us. We found that six out of seven strains of *B. fragilis* tested were capable of adhering to a primary cell, obtained from

guinea pig carcass (GPC). The correlation observed with the results of the hemagglutination tests suggests that GPC cells can be useful as an alternative cell line in the study of *B. fragilis* adherence. In spite of being a primary isolate, the possibility of using these cells is of great value for us. The methodology to obtain the GPC cells is relatively easy (Basic Laboratory Techniques in cell cultures: CDC, Atlanta, 1981) and the test showed good reproducibility. It is clear, however, that quantitative approaches must be adopted and that further studies will be necessary.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants of the following national institutions: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) and Conselho de Ensino para Graduados da

Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEPG/UFRJ).

RESUMO

Aderência de cepas de *Bacteroides fragilis* a cultura de célula primária

Foi avaliada a capacidade de aderência de cepas de *Bacteroides fragilis* a várias linhagens de células de mamíferos. Algumas cepas, definidas como capazes de aglutinar eritrócitos humanos, foram capazes de aderir a células primárias, obtidas de carcaça de cobaio, mas não às demais células testadas. Apenas uma cepa, não aglutinante, não demonstrou qualquer capacidade de aderência às linhagens celulares testadas.

Received for publication in 02/04/90.

INFORMAÇÕES TÉCNICO-CIENTÍFICAS

VIII CURSO DE VERÃO DE CRONOBIOLOGIA 21 DE JANEIRO A 01 DE FEVEREIRO DE 1991 FIOCRUZ - RIO DE JANEIRO

O Curso de Verão de Cronobiologia é um curso de Aperfeiçoamento da Universidade de São Paulo ministrado desde 1984 pelo Grupo Multidisciplinar de Desenvolvimento e Ritmos Biológicos (GMDRB) do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

O objetivo do Curso de Verão é apresentar de forma sistemática essa nova área do conhecimento que trata da organização temporal da matéria viva, a Cronobiologia. O público ao qual se destina esse curso é o de profissionais da área da saúde, tanto aqueles envolvidos em pesquisa básica como profissional na área da saúde e/ou biologia.

Em sua oitava versão, o Curso de Verão de Cronobiologia será ministrado no Rio de Janeiro como promoção conjunta do GMDRB com pesquisadores da FIOCRUZ ligados ao Grupo de Cronobiologia (Departamento de Biologia, Instituto Oswaldo Cruz) e ao Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Escola Nacional de Saúde Pública).

Informações e Inscrições:

VIII CURSO DE VERÃO DE
CRONOBIOLOGIA
Profa. Lúcia Rotenberg
Departamento de Biologia
Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ
Pavilhão Lauro Travassos
Av. Brasil, 4365
21045, RIO DE JANEIRO, RJ
TEL. (021) 290-1146

PRAZO-LIMITE PARA INSCRIÇÃO: 21/12/90
VAGAS LIMITADAS

ENVIRONMENTAL TOXICITY AND WATER QUALITY

A Revista "Environmental Toxicity and Water Quality" (inicialmente "Toxicity Assessment") publicada pela John Wiley & Sons é indexada no "Current Contents".

Esta revista publica trabalhos originais sobre testes de toxicidade, de mutagenicidade, em amostras ambientais, bem como sobre: bacteriologia, virologia, micologia, fisiologia, parasitologia, relacionados à qualidade de água e esgotos, e também biologia de processos de tratamento, qualidade química da água.

A revista é de alto nível, publicada cada três meses e seus editores gostariam de receber trabalhos de pesquisadores de América Latina e Caribe. A publicação deverá ser em idioma inglês. Os trabalhos deverão ser enviados para o editor Regional:

Maria Therezinha Martins
Av. Lineu Prestes, 1374
CEP 05508 - São Paulo
SP, Brasil.

A editoração geral está a cargo de:

B. J. Dutka & D. Liu
Canadian Centre for Inland Waters
Burlington Ontario-Canada, L7R3X8

LILACS

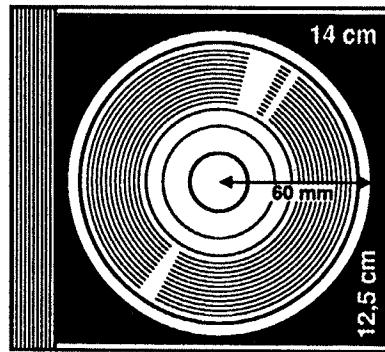
CD-ROM



*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.