

Revista de Microbiologia



SBM

**Sociedade
Brasileira de
Microbiologia**

São Paulo – Brasil

Volume 22 Número 3 Jul. – Set. 1991

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 significativa 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 FORMAÇÃO DOS MANUSCRITOS: Datilografe 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



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
Alcides Serzedello
Allen Norton Hagler
Ana Clara G. Schenberg
Andrejus Korolkovas
Antonio Fernando Pestana de Castro
Aramis Augusto Pinto
Arlete Emily Cury
Astrea Mennuci Giesbrecht
Augusto Cezar Montelli
Caio Marcio Figueiredo Mendes
Carlos da Silva Lacaz
Carmo Elias A. Melles
Celeste Fava Netto
Claudete Rodrigues Paula
Daison Olzany Silva
Edmar Chartone de Souza
Ernesto Hofer
Flávio Alterthum
Galba Maria Campos Takaki
Hermann Gonçalves Schatzmayr
Homero Fonseca
Ises de Almeida Abrahanson
João Lúcio de Azevedo
Johanna Dobereiner

José Alberto Neves Candeias
Leda Cristina Santana Mendonça Hagler
Leon Rabinovitch
Luiz Rachid Trabulsi
Marcelo Magalhães
Maria Aparecida Shikanai Yasuda
Maria Lucia B.O. Rác
Maria Regina Fernandes Toledo
Maria Therezinha Martins
Mauro Faber de Freitas Leilão
Milton de Uzeda
Myrna Sabino
Moacyr Alcojarado Rebello
Paulo Hideki Yasuda
Paulo Suyoshi Minami
Romain Rolland Golgher
Sebastião Timo Iaria
Sérgio Olavo Pinto da Costa
Sérgio Eduardo Longo Fracallanza
Sílvia Arruda Vasconcelos
Sumie Hoshino Shimizu
Vera Lucia Garcia Calich
Waldemar Francisco
Walderez Gambale
Willibaldo Schmidell Netto
Zoilo Pires Camargo

Secretária 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 Nautchnoi 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
	Secretária Geral Lúcia Martins Teixeira Inst. de Microbiologia - UFRJ Centro de Ciências da Saúde - Bl.1 Ilha do Fundão 21944 - Rio de Janeiro - RJ	1º Tesoureiro Leonardo Peregó Jr. Fac. de Ciências Farmacêuticas - USP Conjunto das Químicas Cidade Universitária 05508 - São Paulo - SP
	2ª Secretária Rosana F. Vazoller USP-São Carlos	2º Tesoureiro Roberto M. Yanaguita Inst. de Ciências Biomédicas - USP Dept.º de Microbiologia Av. Prof. Lineu Prestes, 1.374 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 (Rosana L. Vazoller - UFS Carlos);
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

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



REVISTA DE MICROBIOLOGIA
 PUBLICAÇÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA
 VOLUME 22 JULHO-SETEMBRO 1991 NÚMERO 3
 REV. MICROBIOL. (S. PAULO), 22(3)

CONTEÚDO-CONTENTS

PÁG.

<p>Montelli, A. C.; Levy, C. E. Sistema COBA 1988 – Aspectos relativos aos dados dos laboratórios de referência.....</p>	<p>197</p>
<p>Montelli, A. C. Considerações sobre os 10 anos de atividades do Sistema COBA.....</p>	<p>206</p>
<p>Ferreira, L. A. P.; Ferreira, P. C. P.; Kroon, E. G.; Trindade, M. L.; Golgher, R. R. A concentração de interferon humano de membranas amnióticas: I - Métodos Físicos The concentration of the human amniotic membrane interferon: I - Physical Methods.....</p>	<p>210</p>
<p>Ferreira, L. A. P.; Ferreira, P. C. P.; Kroon, E. G.; Gonzaga, C.; Santos, J. R. dos; Golgher, R. R. A concentração de interferon humano de membranas amnióticas: II - Métodos Químicos Concentrations of the human amniotic membrane interferon: II - Chemical Methods.....</p>	<p>216</p>
<p>Pimenta, C. G.; Ferreira, P. C. P.; Ferreira, L. A. P.; Golgher, R. R. Purification of human amniotic membrane interferon by affinity chromatography Purificação de interferon humano de membranas amnióticas por cromatografia de afinidade.....</p>	<p>221</p>
<p>Oliveira, L. H. S.; Yoshida, C. F. T.; Monteiro, S. S.; Câmara, F. P. Seroepidemiological survey for hepatitis A and B markers in health care students from a public university of Rio de Janeiro, Brazil.....</p>	<p>226</p>
<p>Avila-Campos, M. J.; Carvalho, M. A. R. de; Damasceno, C. A. V.; Chartone-Souza, E.; Cisalpino, E. O. Sensitivity to mercuric chloride of <i>Bacteroides fragilis</i> group isolates in different growth media: medium-dependent variation Sensibilidade ao biocloreto de mercúrio de isolados de grupo <i>Bacteroides fragilis</i> em diferentes meios de cultura: variação meio-dependente.....</p>	<p>232</p>
<p>Sutich, E. G.; Belmonte, A.; Noguera, M.; Llop, M. M. Esquema simplificado de identificación de las especies de <i>Staphylococcus coagulasa-negativa</i> aislados de infecciones humanas Identification simplified scheme for coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> strains isolated from human infections.....</p>	<p>237</p>
<p>Cardoso, C. L.; Bedendo, J.; Bronharo, M. C.; Moribi, L. A.; Garcia, L. B. Ocorrência de estirpes de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a oxacilina em servidores hospitalares Occurrence of oxacilin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> strains in hospital personnel.....</p>	<p>242</p>

Pagnocca, F. C.; Hagler, L. C. M.; Hagler, A. N. Heterotrophic bacteria associated with the shrimp <i>Peneaus schimitti</i> , sediment and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil.....	247
Lombardi, M. L. C. O.; Oliveira, P. A. Eficiência de estirpes de <i>Bradyrhizobium</i> sp., na fixação do nitrogênio em amendoim (<i>Arachis hypogaea</i> , L.) Efficiency of <i>Bradyrhizobium</i> sp., strains on nitrogen fixation in peanut (<i>Arachis hypogaea</i> , L.)...	253
Machoshvili, I. A.; Penna, T. C. V.; Colombo, A. J. Resistência térmica de <i>Staphylococcus aureus</i> em leite de soja com ou sem acréscimo de ingredientes Heat resistance parameters of <i>Staphylococcus aureus</i> in soybean milk and soybean milk with additives.....	257
Costa, C. P.; Ferreira, M. C. Preservação de microrganismos: Revisão Preservation of microorganisms: a Review.....	263
Avila-Campos, M. J.; Carvalho, M. A. R. de; Raymundo, N. L. S.; Farias, L. de M.; Damasceno, C. A. V.; Cisalpino, E. O. "In vitro" susceptibility to Imipenem of <i>Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans</i> strains isolated in Brazil Susceptibilidade "in vitro" ao Imipenem de cepas de <i>Actinobacillus (Haemophilus) actinomyce- temcomitans</i> , isoladas no Brasil.....	269
Pires, M. de F. C.; Purchio, A. Micological evolution of filtrated juice of <i>Agave sisalana</i> perrine's leafe Utilização de suco filtrado da folha de <i>Agave sisalana</i> para inibição do crescimento de fungos toxigênicos.....	272

SISTEMA COBA 1988 — ASPECTOS RELATIVOS AOS DADOS DOS LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA

Augusto Cezar Montelli¹
Carlos Emilio Levy¹

Em 1988 foram processados dados relativos a cerca de 31.000 antibiogramas realizados pelos laboratórios que participam do Sistema COBA. Destes, aproximadamente 19.000 tiveram origem nos laboratórios de Referência do Sistema, correspondendo a 61% do total de antibiogramas considerados

Os Laboratórios de Referência envolvidos foram os seguintes:

- São Paulo - Hospital Universitário da USP, Laboratório Fleury, Gastroclínica;
- Ribeirão Preto - Hospital das Clínicas da FMRP, USP;
- Recife - Laboratório LAPAC;
- Rio de Janeiro - Hospital das Clínicas da UERJ;

- Belo Horizonte - Hospital das Clínicas da UFMG;
- Porto Alegre - Laboratório do Hospital São Lucas;
- Curitiba - Hospital das Clínicas da UFP.

Para análise das informações geradas pelo processamento eletrônico consideramos os 15 germes mais freqüentes e cujos números de cepas testadas obedeceram ao mínimo estabelecido pela Comissão de Análise. Os resultados, expressos em percentual de amostras resistentes, relativos a 24 antimicrobianos encontram-se nas Tabelas 1A e 1B, onde verificamos como bactérias prevalentes: *E. coli*, *S. aureus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*, todas com mais de 1000 amostras submetidas ao antibiograma.

TABELA 1A – Distribuição das amostras bacterianas testadas e do percentual de resistência, de acordo com os germes e as drogas (Sistema COBA, Laboratórios de Referência, 1988).

GERMES	Nº total Cepas Testadas	Amp.	Ami.	Gen.	Net.	Tob.	Cft.	Cef.	Cet.	Cex.	Tet.	Clo.	Su+Tri
<i>E. coli</i>	7038	58	4	5	3	7	25	3	0	0	48	38	52
<i>S. aureus</i>	2832	76	14	24	7	25	16	15	22	17	38	22	19
<i>Klebsiella</i>	1887	86	12	27	22	28	37	14	5	3	41	45	43
<i>P. aeruginosa</i>	1627	NR	19	40	44	35	NR	NR	75	34	NR	89	NR
<i>Enterobacter</i>	1114	80	13	31	21	32	62	77	20	16	39	41	40
<i>Enterococcus</i>	847	11	83	75	26	80	86	NR	87	61	70	44	58
<i>P. mirabilis</i>	974	37	2	10	7	6	19	6	2	1	98	38	38
<i>Pseudomonas sp</i>	506	91	23	53	38	47	57	98	66	27	82	73	74
<i>Proteus indol+</i>	418	65	4	10	3	11	75	12	2	1	74	41	37
<i>Acinetobacter</i>	363	68	46	41	29	43	82	80	61	36	41	77	48
<i>Serratia</i>	416	88	36	66	60	58	95	40	11	3	90	71	63
<i>Citrobacter</i>	255	61	21	24	19	41	60	55	25	12	35	36	49
<i>Shigella</i>	413	33	3	1	1	2	7	2	4	0	71	28	66
<i>Salmonella</i>	198	35	7	16	19	17	19	4	1	2	18	18	30
<i>Providencia</i>	46	71	2	36	41	27	83	5	0	0	78	59	65

Amp.: Ampicilina; Ami.: Amicacina; Gen.: Gentamicina; Net.: Netilmicina; Tob.: Tobramicina; Cft.: Cefalotina; Cef.: Cefoxitina; Cet.: Cefotaxima; Cex.: Ceftriaxone; Tet.: Tetraciclina; Clo.: Cloranfenicol; Su+Tri.: Sulfazotrim.

1. Membro da Comissão de Análise do Sistema COBA da Sociedade Brasileira de Microbiologia

TABELA 1B - Distribuição das amostras bacterianas testadas e do percentual de resistência, de acordo com os germes e as drogas (Sistema COBA, Laboratórios de Referência, 1988).

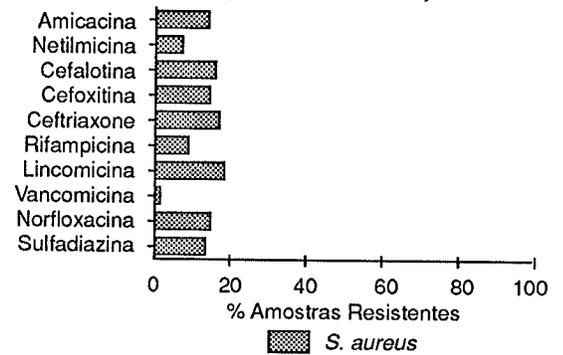
GERMES	Nº total Cepas Testadas	Fosfo.	Carb.	Rif.	Pen.G	Oxac.	Eritr.	Linc.	Van.	Ac.Nal	Ac. Pip	Norf.	Sulfa
<i>E. coli</i>	7038	19	57	59	NR	NR	NR	NR	NR	8	8	0	58
<i>S. aureus</i>	2832	23	NR	9	85	21	32	18	1	77	79	15	14
<i>Klebsiella</i>	1887	47	82	84	NR	NR	NR	NR	NR	26	27	7	60
<i>P. aeruginosa</i>	1627	63	37	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	82	24	NR
<i>Enterobacter</i>	1114	53	51	74	NR	NR	NR	NR	NR	22	28	10	46
<i>Enterococcus</i>	847	61	NR	24	46	NR	64	90	3	NR	NR	55	96
<i>P. mirabilis</i>	974	22	22	40	NR	NR	NR	NR	NR	11	9	1	29
<i>Pseudomonas</i>	506	86	43	67	NR	NR	NR	NR	NR	84	58	13	67
<i>Proteus indol+</i>	418	54	19	53	NR	NR	NR	NR	NR	15	16	4	43
<i>Acinetobacter</i>	363	93	44	16	NR	NR	NR	NR	NR	52	100	42	43
<i>Serratia</i>	416	22	74	71	NR	NR	NR	NR	NR	40	57	10	30
<i>Citrobacter</i>	255	10	56	100	NR	NR	NR	NR	NR	23	29	7	67
<i>Shigella</i>	413	3	32	60	NR	NR	NR	NR	NR	0	0	0	96
<i>Salmonella</i>	198	14	33	58	NR	NR	NR	NR	NR	17	38	0	58
<i>Providencia</i>	46	48	39	50	NR	NR	NR	NR	NR	32	25	38	100

Fosfo.: Fosfomicina; Carb.: Carbenicilina; Rif.: Rifampicina; Pen.G: Penicilina G; Oxac.: Oxacilina; Eritr.: Eritromicina; Linc.: Lincomicina; Van.: Vancomicina; Ac. Nal.: Ácido Nalidixico; Ac. Pip.: Ácido Pipemídico; Norf.: Norfloxacin; Sulfa.: Sulfadiazina.

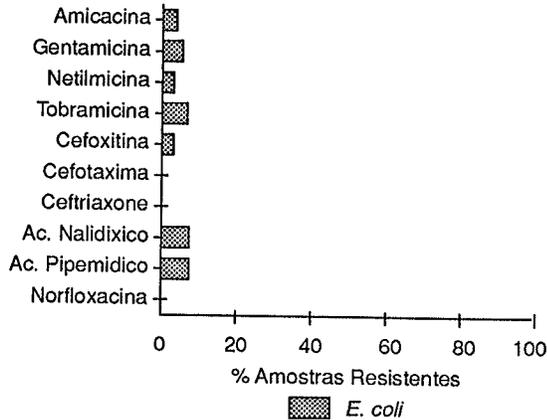
Os gráficos da Figura 1 projetam para 12 bactérias de grande importância médica os percentuais de cepas resistentes aos 10 antimicrobianos de maior atuação "in vitro" frente a cada uma delas. De um modo geral, podemos verificar que *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Serratia*, *Enterococcus* e *Pseudomonas* sp apresentaram-se como os germes mais resistentes, mesmo frente às drogas de maior atividade. Por outro

FIGURA 1 - Percentuais de amostras resistentes às 10 drogas de maior atividade "in vitro" para 12 bactérias de alta prevalência nos antibiogramas (Sistema COBA, 1988)

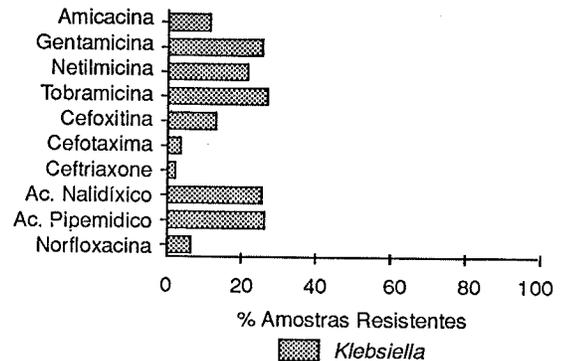
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



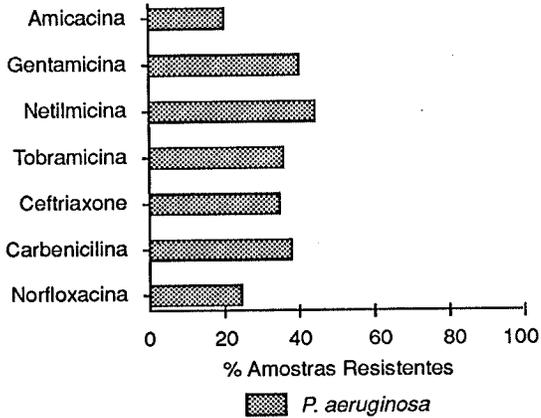
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



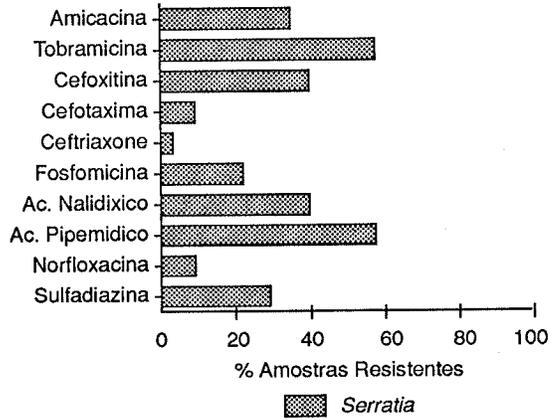
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



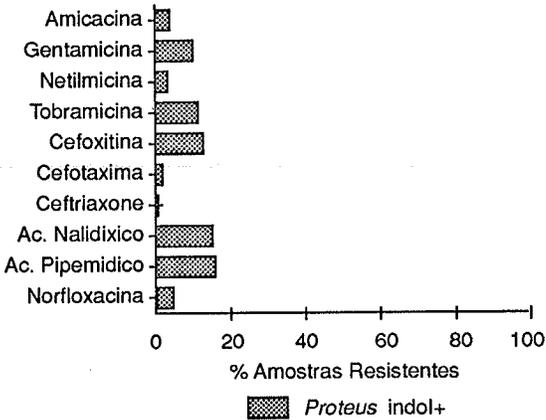
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



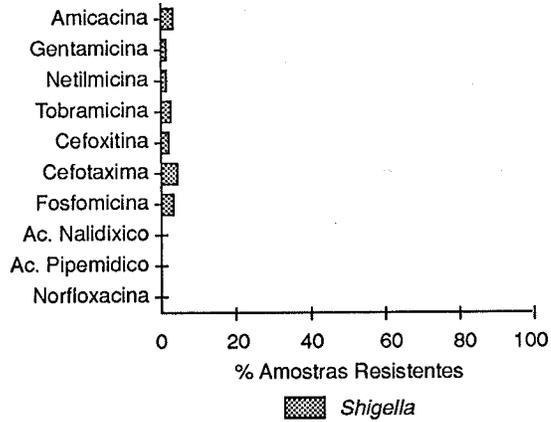
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



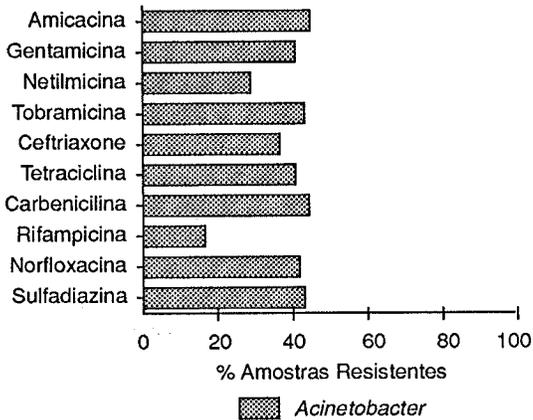
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



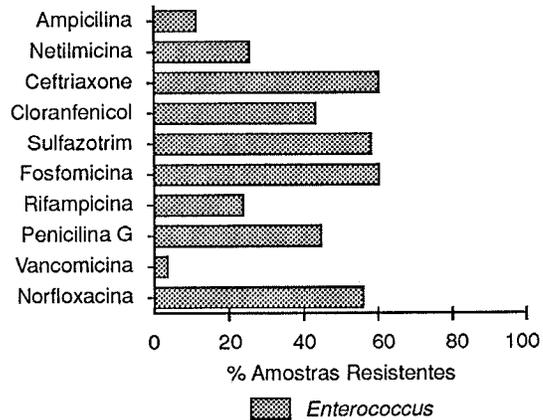
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



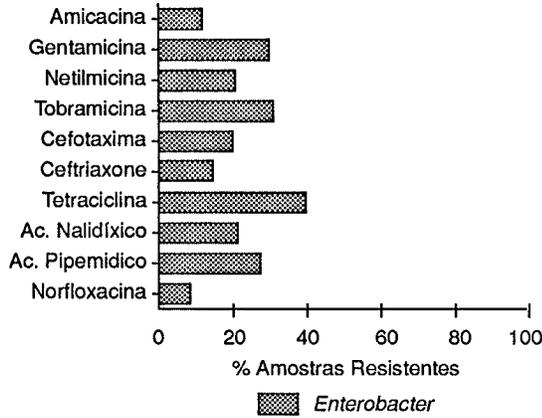
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



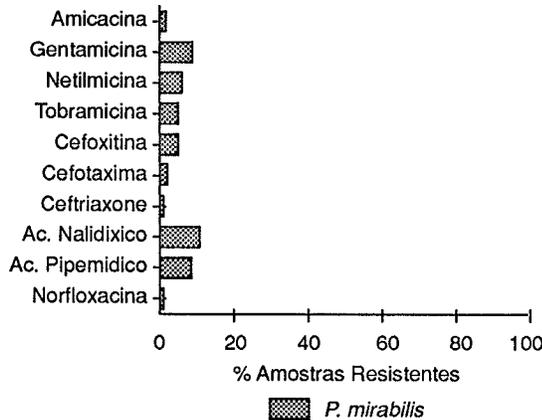
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



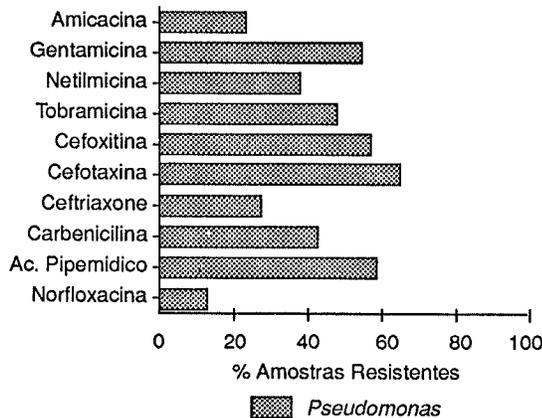
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



lado, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Shigella* caracterizaram-se como bactérias de menores proporções de amostras resistentes.

Efetuando-se análise global dos dados por meio do critério de "faixas de resistência", adotado anteriormente pela Comissão de Análise:

- de 0-20% de amostras resistentes – resistência baixa (RB),
- de 21-50% de amostras resistentes – resistência intermediária (RI),
- de 51-100% de amostras resistentes – resistência alta (RA),

encontramos na faixa RB as drogas mais eficazes para cada *germe* considerado, conforme sumarizado abaixo:

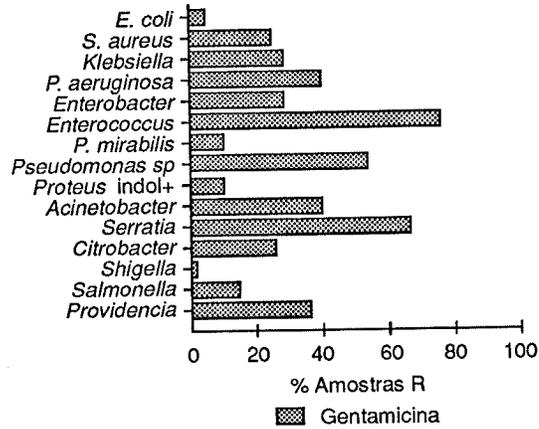
GERMES	DROGAS*
<i>E. COLI</i>	AMI, GEN, NET, TOB, CEF, CET, CEX, FOSFO, AC. NAL, AC. PIP e NORF
<i>KLEBSIELLA</i>	AMI, CEF, CET, CEX e NORF.
<i>ENTEROBACTER</i>	AMI, CET, CEX e NORF
<i>SERRATIA</i>	CET, CEX e NORF.
<i>PROTEUS MIRABILIS</i>	AMI, GEN, NET, TOB, CFT, CEF, CET, CEX, AC. NAL, AC. PIP e NORF.
<i>PROTEUS INDOL (+)</i>	AMI, GEN, NET, TOB, CEF, CET, CEX, CARB, AC. NAL, AC. PIP e NORF.
<i>CITROBACTER</i>	NET, CEX, FOSFO e NORF.
<i>SHIGELLA</i>	AMI, GEN, NET, TOB, CFT, CEF, CET, CEX, FOSFO, AC. NAL, AC. PIP e NORF.
<i>SALMONELLA</i>	AMI, GEN, NET, TOB, CFT, CEF, CET, CEX, TET, CLO, FOSFO, AC. NAL e NORF.
<i>PROVIDENCIA</i>	AMI, CEF, CET e CEX.
<i>P. AERUGINOSA</i>	AMI.
<i>PSEUDOMONAS sp</i>	NORF.
<i>ACINETOBACTER</i>	RIF.
<i>S. AUREUS</i>	AMI, NET, CFT, CEF, CEX, SU+TRI, RIF, LINC, VANC e NORF.
<i>ENTEROCOCCUS</i>	AMP e VANC.

Amp.: Ampicilina; Ami.: Amicacina; Gen.: Gentamicina; Net.: Netilmicina; Tob.: Tobramicina; Cft.: Cefalotina; Cef.: Cefoxitina; Cet.: Cefotaxima; Cex.: Ceftriaxone; Tet.: Tetraciclina; Clo.: Cloranfenicol; Su+Tri.: Sulfazotrim.Fosfo.: Fosfomicina; Carb.: Carbenicilina; Rif.: Rifampicina; Pen.G: Penicilina G; Oxac.: Oxacilina; Eritr.: Eritromicina; Linc.: Lincomicina; Van.: Vancomicina; Ac. Nal.: Ácido Nalidixico; Ac. Pip.: Ácido Pipemídico; Norf.: Norfloxacina; Sulfa.: Sulfadiazina.

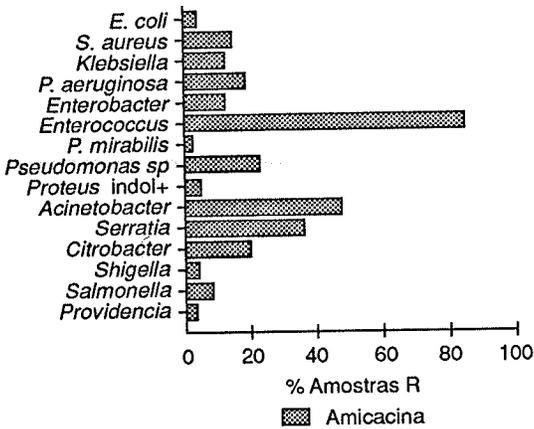
Na Figura 2 os gráficos de cada uma das 24 drogas analisadas expressam a proporção de amostras resistentes para os diferentes gêneros ou espécies bacterianas implicadas. De maneira geral, os antimicrobianos que apresentaram maior atividade "in vitro" foram - amicacina, ceftriaxone, cefotaxima, norfloxacina e vancomicina. Ao contrário, constituíram-se como drogas de menor atuação - sulfamídicos, tetraciclina, ampicilina e penicilina G. Houve acentuada variação de atividade dos diversos antimicrobianos em relação aos germes considerados.

FIGURA 2 - Atividades "in vitro" de 24 antimicrobianos (em percentual de amostras resistentes) e de acordo com a bactéria (Sistema COBA, 1988)

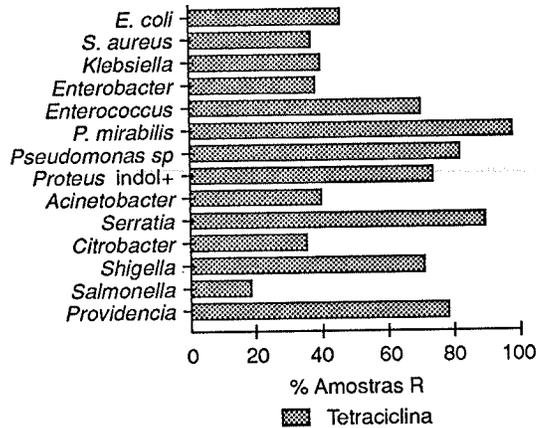
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



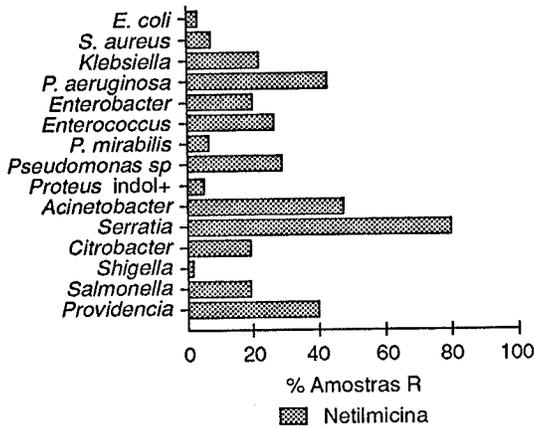
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



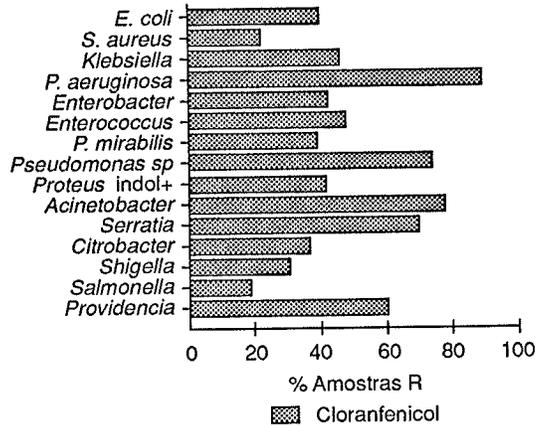
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



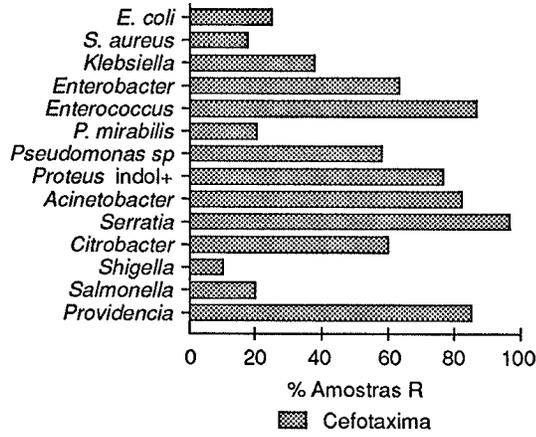
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



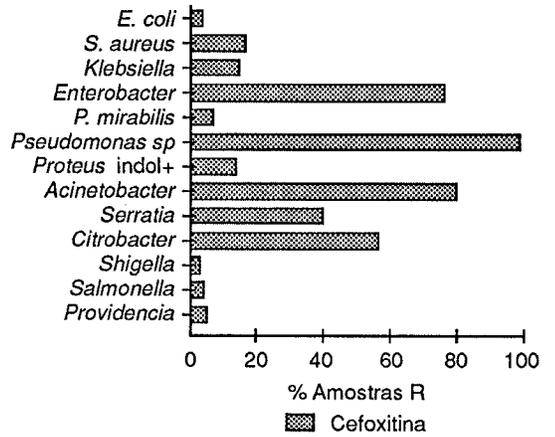
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



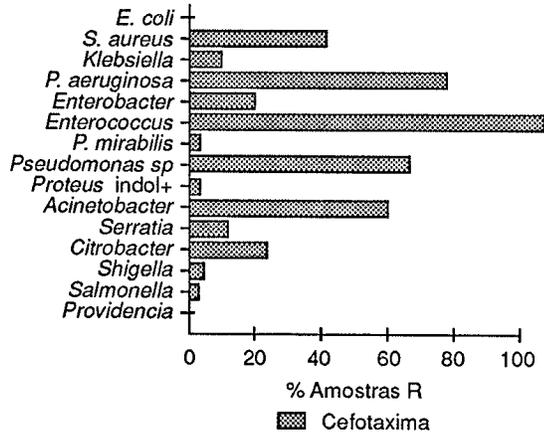
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



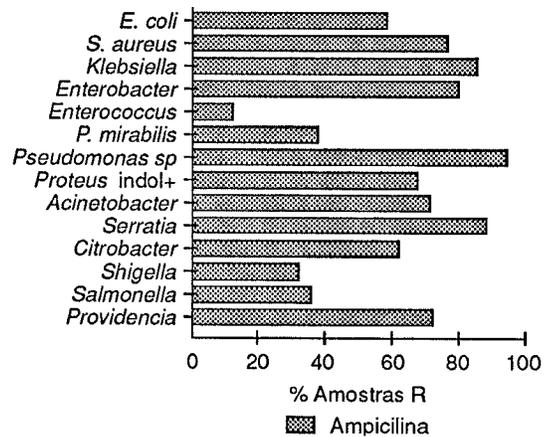
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



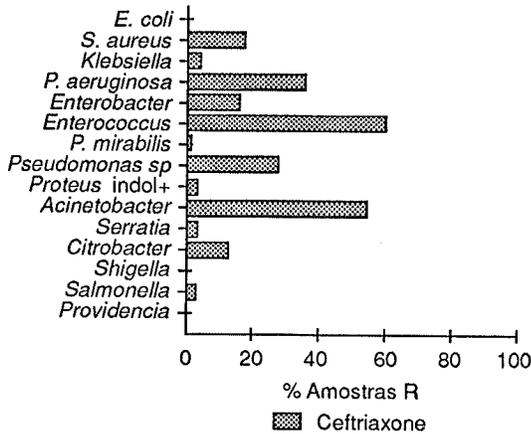
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



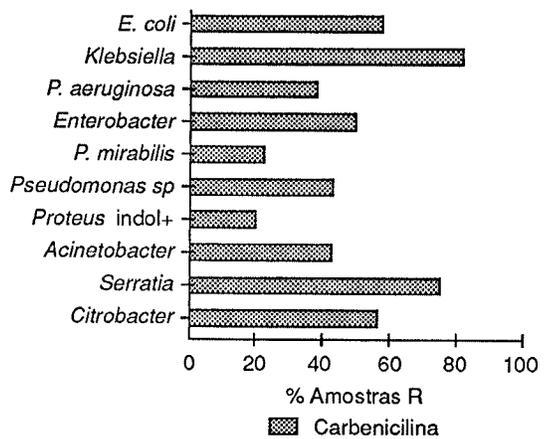
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



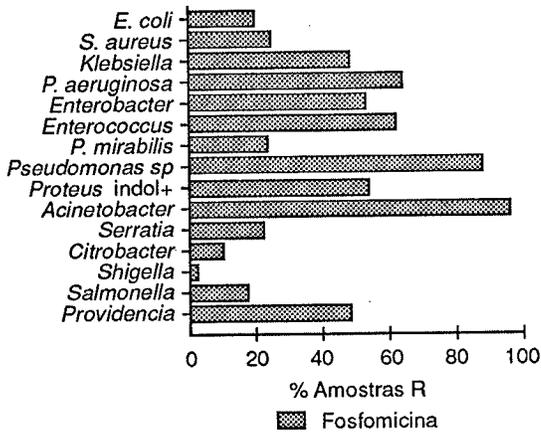
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



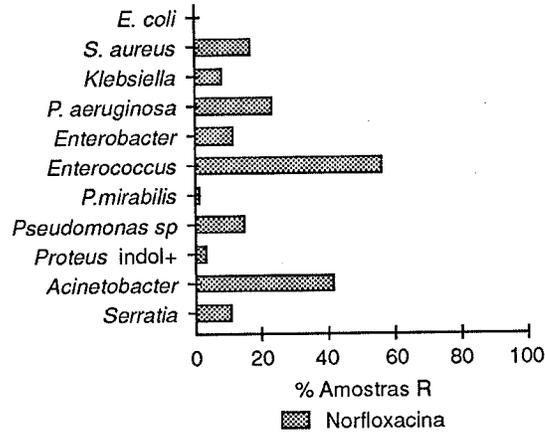
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



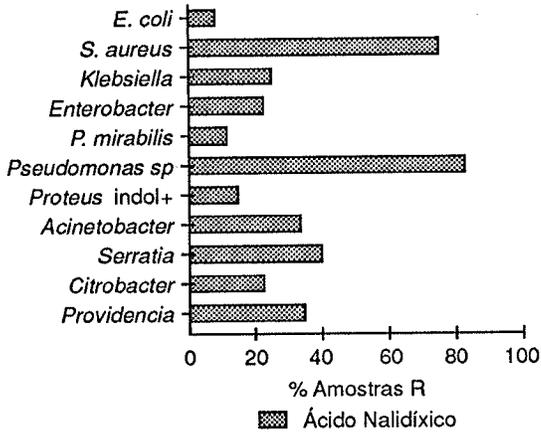
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



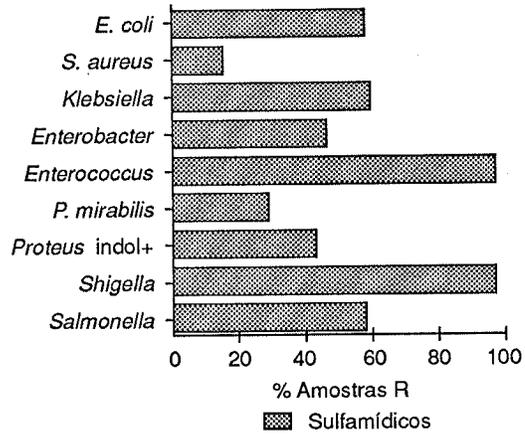
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



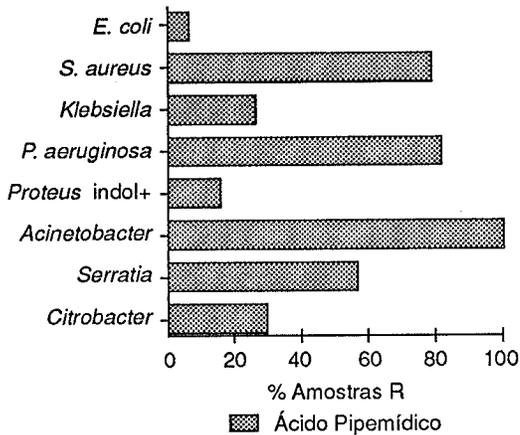
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



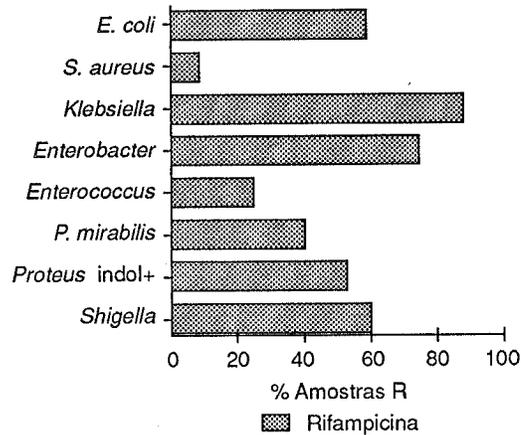
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



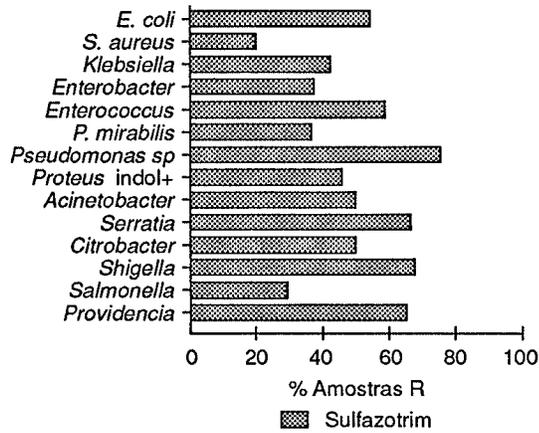
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



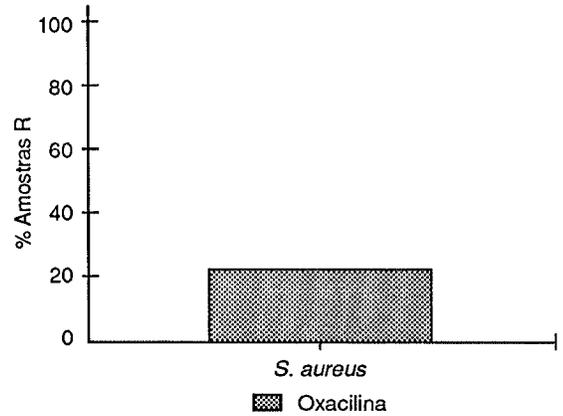
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



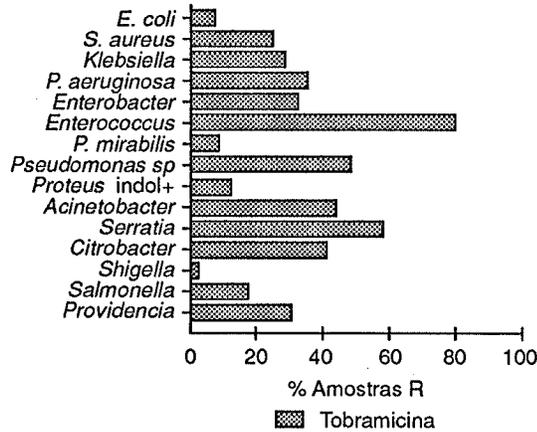
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



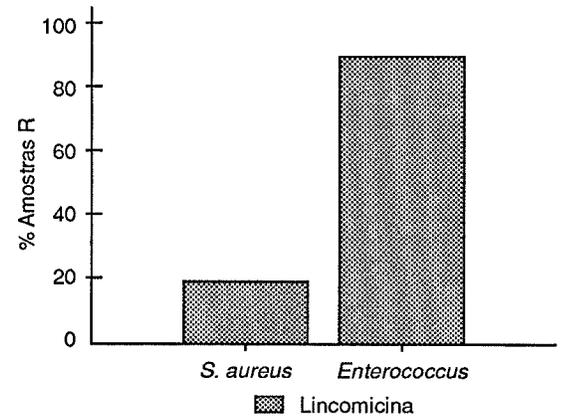
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



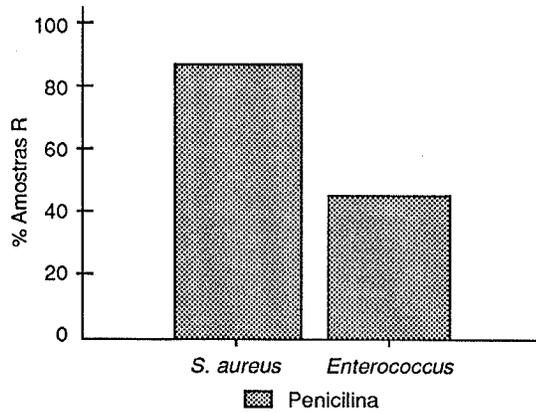
Sistema Coba, Lab. Referência, 1988



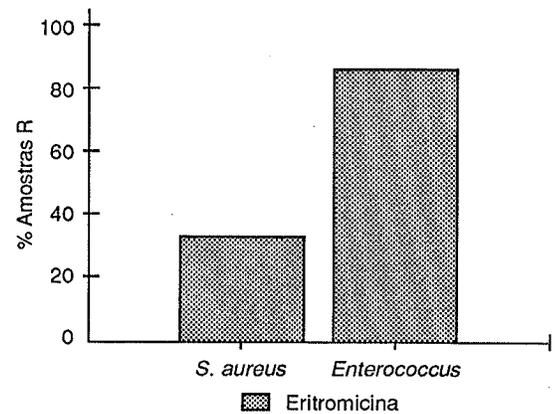
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



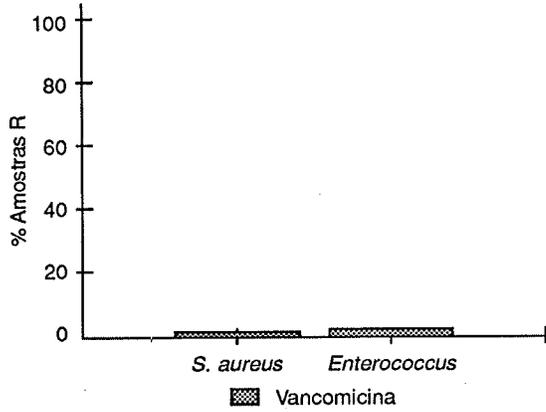
Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



Sistema COBA, Lab. Referência, 1988



Estas informações geradas pelo Sistema COBA em 1988 podem se constituir num dos referenciais objetivos com que contam os médicos no momento de decidir sobre a melhor conduta terapêutica frente à infecção por determinado germe, principalmente, quando ainda não tenham em mãos o desejado antibiograma.

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS 10 ANOS DE ATIVIDADES DO SISTEMA COBA

Augusto Cezar Montelli*

O Sistema COBA (Controle Bacteriológico) foi instituído com o propósito fundamental de estabelecer *banco de dados* na área de Microbiologia Clínica, a nível nacional, por meio de informações sobre a *ocorrência* de germes patogênicos isolados de material clínico na atividade de rotina dos laboratórios de análise e a *sensibilidade aos antimicrobianos* apresentada por estes microrganismos. O Sistema foi implantado a partir de 1980, sobretudo para criar, após processamento eletrônico e análise dos dados, fonte de informações fidedignas, que refletisse a realidade do país. O Sistema foi conduzido pela *Sociedade Brasileira de Microbiologia* – por meio das Comissões de Análise e de Auditoria – responsável pelos aspectos técnico-científicos do programa, análise e divulgação dos dados e de documentos correlatos, com o apoio do Serviço de Atualização Médica da Merck, Sharp & Dohme – a quem competiu o desenvolvimento computacional do Sistema, o recolhimento periódico dos resultados dos antibiogramas nos laboratórios participantes e a cobertura dos custos operacionais implicados.

No correr do ano de 1981 esforços dirigidos para o levantamento e análise dos dados obtidos pelo Sistema em 1980 resultaram na publicação "*Projeto COBA – Análise preliminar de resultados*" (1), envolvendo cerca de 30.000 antibiogramas. Estes se originaram do empenho de participação de 94 laboratórios de microbiologia situados em 6 capitais brasileiras – Rio de Janeiro, São Paulo, Belo Horizonte, Curitiba, Porto Alegre e Salvador, que responderam positivamente ao convite formulado pela SBM.

A abordagem concisa e crítica dos dados permitiu detectar uma série de *impropriedades* no uso (em geral, indiscriminado e pouco criterioso) e na *execução* do antibiograma e/ou na *identificação* bacteriana. Desse modo, perderam os dados coletados, globalmente, a confiabilidade necessária para divulgação oficial. Alguns aspectos dessa análise mereceram destaque:

1. Em relação aos germes testados nos antibiogramas;
2. Em relação às drogas utilizadas nos testes;
3. Em relação aos resultados obtidos nos antibiogramas.

Entre 1981 e 1983, com todos os laboratórios participantes já tendo recebido *normas técnico-científicas* (7) de atuação (metodologia normatizada, compreendendo bactérias selecionadas para análise, as provas mínimas necessárias para a sua identificação e a técnica recomendada para a execução adequada do antibiograma e de sua interpretação) e várias *publicações* (4,5) geradas pelo Sistema, observou-se, regra geral, manutenção das inadequações anteriormente assinaladas, bem como, da inviabilidade de publicação das informações registradas.

Face à imprecisão persistente de grande parte dos dados recebidos, várias *medidas saneadoras* foram propostas então: divulgação de publicações técnico-científicas, com objetivos normativos ou formativos; elaboração e divulgação periódica do Boletim COBA; reuniões de membros da Comissão de Análise com colegas laboratoristas das diversas cidades; divulgação de dados relativos ao Sistema em Congressos, Simpósios ou palestras; e, principalmente, a de intensificar esforços para o estabelecimento de um *sistema referencial*, constituído de um conjunto de 1-3 Laboratórios de Referência por cidade constante do programa. Planejado desde o início, o *sistema referencial* só foi estabelecido no correr de 1984, sendo inicialmente integrado por 5 laboratórios, que se distinguiram por sua adequada atuação no programa: Hospital do Servidor Público Estadual (São Paulo), Gastroclínica (São Paulo), Hospital Universitário da USP (São Paulo), Hospital Universitário da UERJ (Rio de Janeiro) e Hospital São Lucas (Porto Alegre).

Com a concretização das propostas enunciadas houve, com o correr do tempo, estabelecimento de condições favoráveis à divulgação de

* Professor Titular do Departamento de Clínica Médica da F. M. Botucatu
Membro da Comissão de Análise do Sistema COBA

dados globalizados do Sistema, sempre relativos aos Laboratórios de Referência. Assim, os laboratórios participantes (terminais de informação) passaram a receber, além dos relatórios computacionais de seus próprios dados, informações periódicas sobre o *sistema de referência* (dados globalizados; por material clínico; por serviço hospitalar; por cidade ou região, etc). Foram também publicados, sob diversas formas, vários *trabalhos*(2,6), cujos conteúdos apresentavam valiosos subsídios de natureza prática em relação ao Laboratório de Microbiologia, a atuação médica, ao Hospital (particularmente, às Comissões de Controle de Infecção Hospitalar) e à Saúde Pública. Por outro lado, editorado e distribuído periodicamente (8 números até 1988), o Boletim COBA foi outro instrumento utilizado como meio de educação e informação.

O Sistema de Referência foi progressivamente ampliado, em cumprimento a uma das metas planejadas. Para tanto, os laboratórios convidados foram selecionados pelo mérito demonstra do em sua participação como "terminal de informação": Laboratório de Patologia Clínica - LAPAC (Recife), Laboratório do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), Laboratório Fleury (São Paulo), Laboratório do Hospital das Clínicas da U.F.M.G e Laboratório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal do Paraná.

Desse modo, a Comissão de Análise pode centrar seus esforços de análise e produção de documentos (3) num contingente de dados gradativamente mais abrangente, representativo de diversas regiões importantes do país. Todo material gerado foi encaminhado aos laboratórios participantes do Sistema, aos sócios da SBM e, alguns deles, a organismos governamentais e classe médica.

Entretanto, os dados fornecidos pelos "terminais de informação", embora continuassem a ser processados e encaminhados aos laboratórios respectivos, não tiveram oportunidade de ser analisados isolada ou globalmente, como ocorreu com os de 1980.

Como a decisão de encerrar os trabalhos do Sistema COBA se deu em julho de 1989, os últimos dados computados foram os do primeiro semestre deste ano, completando o ciclo de 10 anos de atividades do programa.

Nesta oportunidade nos pareceu interessante, e até mesmo imperiosa, análise abrangente da totalidade de informações produzida pelos laboratórios participantes nestes últimos 6 meses de

colaboração, à semelhança e com a mesma metodologia da "Análise preliminar de resultados". Talvez, com isso se possa aportar novos subsídios para configuração da realidade atual do trabalho microbiológico dos laboratórios que integraram o Sistema COBA na sua fase final.

SISTEMA COBA - ANÁLISE FINAL DE RESULTADOS

Os relatórios emitidos após computação das informações encaminhadas pelos laboratórios de microbiologia participantes do Sistema COBA durante o primeiro semestre de 1989 referem-se a 22.613 antibiogramas. De acordo com a programação estabelecida anteriormente, compreendeu dados relativos a 18 bactérias (entre *S. aureus*, Enterococos, *Enterobactérias* e *Pseudomonas*) e 30 antimicrobianos. Desse modo, muitas das análises efetuadas na "Análise preliminar"(1) (envolvendo numerosos outros germes e drogas, pois, não havia na época nenhuma normatização) não poderão agora ser feitas, uma vez que os formulários padronizados (e entregues aos laboratórios para a transcrição dos resultados dos antibiogramas) já restringem as opções de bactérias e antimicrobianos.

A análise objetiva dos dados relacionados aos 22.613 antibiogramas efetua-se sob os seguintes aspectos:

A. EM RELAÇÃO AOS GERMES ESTUDADOS:

1. Bactéria da flora normal para o material clínico de origem - *Enterobactérias* (diversas) fezes → (± 600) *S. aureus* e *Enterococos* → fezes (14) *Pseudomonas* → fezes (4)

2. Bactérias potencialmente patogênicas, porém, isoladas de material clínico onde não são descritas ou o são raramente

Shigella → Urina, sangue, ferida cirúrgica, secreção genital feminino, orofaringe (40)

Salmonella → Escarro, secreção orofaríngea e outras secreções (10)

Yersinia enterocolitica → Urina (1)

3. Índice de compatibilidade da etiologia, segundo o material clínico

$$\text{ÍNDICE} = \frac{\text{N}^\circ \text{ BACTÉRIAS COMPATÍVEIS COM A ETIOLOGIA}}{\text{N}^\circ \text{ TOTAL DE BACTÉRIAS ISOLADAS E TESTADAS}} \times 100$$

Ex: I fezes = 38,5%.

B. EM RELAÇÃO ÀS DROGAS UTILIZADAS NO ANTIBIOGRAMA:

1. Drogas empregadas inapropriadamente, segundo a bactéria testada

E. coli → penicilina G (702), oxacilina (526), lincomicina (428), eritromicina (751), vancomicina (18)

S. aureus → ácido nalidíxico (427), carbenicilina (1.176), colistina (128)

P. aeruginosa → ácido nalidíxico (308), cefalotina (1.153), cefoxitina (1.357), ampicilina (1.462), penicilina G (214), oxacilina (127), eritromicina (245), sulfazotrim (1.519), nitrofurantoína (287)

2. Drogas empregadas desnecessariamente, uma vez considerado o material clínico de origem

Ácido nalidíxico para → escarro, ferida cirúrgica, secreção orofaríngea, sangue, líquido

Nitrofurantoína para → escarro, secreção orofaríngea, sangue, líquido

Norfloxacina para → escarro, sangue, ferida cirúrgica, secreção orofaríngea

Eritromicina para → líquido

C. EM RELAÇÃO AOS RESULTADOS APRESENTADOS PELOS ANTIBIOGRAMAS:

1. Resistência de certas bactérias em proporção "surpreendentemente" maior que outras, a certa(s) droga(s)

S. typhi>R que outras *Salmonella* → am-

picilina, amicacina, tetraciclina, cefalotina, cefoxitina, gentamicina, tobramicina, netilmicina

Proteus mirabilis>R que outros *Proteus* → tetraciclina, sisomicina, nitrofurantoína

Shigella>R que *Salmonella* → sulfazotrim, ampicilina, tetraciclina, cloranfenicol, imipenem, cefotaxima

S. typhi>R que *P. aeruginosa* → amicacina, carbenicilina, tobramicina, gentamicina

2. Germes freqüentemente sensíveis a certa droga, apresentando relativamente, Índices elevados de cepas resistentes – (% de amostras resistentes)

Salmonella typhi → ampicilina (40), sulfazotrim (37), cefalotina (60), netilmicina (40), cloranfenicol (17), gentamicina (35)

Shigella → ampicilina (47), sulfazotrim (77), cloranfenicol (39), tetraciclina (67)

Proteus mirabilis → ampicilina (52)

3. Germes naturalmente resistentes a certas drogas, apresentando proporção de amostras sensíveis inesperadas – (% de amostras sensíveis)

Colistina → *Proteus indol* (+) (14), *Providencia* (17), *Serratia* (28), *S. aureus* (29)

Vancomicina → *E. coli* (56), *Klebsiella* (23), *Enterobacter* (39), *P. aeruginosa* (34),

Ácido nalidíxico → *S. aureus* (20), *Enterococos* (13), *Pseudomonas sp* (11)

Estas constatações referendam que, para a concretização dos objetivos de um Sistema como o COBA, torna-se necessário trabalhar com menor número de laboratórios, porém de desempenho

satisfatório assegurado pela adoção da metodologia recomendada. Por outro lado, com o diagnóstico da situação estabelecido, compete à Sociedade científica conscientizar – laboratórios, organismos governamentais implicados e médicos – para que possamos juntos encontrar mecanismos mais eficazes de reversão do quadro atual.

BIBLIOGRAFIA

1. Montelli, A.C. - Análise preliminar de resultados - Projeto COBA. SBM:1-10, 1981.
2. Montelli, A.C. - Comparação de sensibilidade a drogas em bactérias isoladas em São Paulo, Rio de Janeiro e Porto Alegre (Sistema COBA, 1980/1984). SBM:1-11, 1985.
3. Montelli, A.C. - Caracterização da sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos no Brasil (1980-1987). *Rev. Bras. Pat. Clin.*, 24:78-82, 1988.
4. Montelli, A.C.; Toledo, M.R.F.; Silva, M.L.R. - Importância do diagnóstico etiológico das infecções e da sensibilidade dos agentes bacterianos às drogas. *Inf. Téc. Cient. SBM*:1-4, 1980.
5. Pereira, A.A.; Silva, M.L.R.; Montelli, A.C. - Considerações sobre a evolução do Projeto COBA. *Inf. Téc. Cient. SBM*:1-5, 1982.
6. Pereira, A.A.; Levy, C.E.; Furtado, J.S. - Sistema COBA: resistência bacteriana a drogas em 1984, 1985, 1986. SBM:1-24, 1987.
7. Sociedade Brasileira de Microbiologia - Sistema COBA- Metodologia Normatizada. *Inf. Téc. Cient. SBM*: 1-3, 1980.

A CONCENTRAÇÃO DE INTERFERON HUMANO DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS: I. MÉTODOS FÍSICOS

Luiz Alberto Peregrino Ferreira¹
Paulo César Peregrino Ferreira
Erna Geessien Kroon
Maria Lúcia Trindade
Romain Rolland Golgher

RESUMO

A concentração de preparações de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA) por métodos físicos foi investigada. As preparações foram obtidas a partir de âmnios infectados com o vírus da doença de Newcastle e o seu título de atividade anti-vírica foi determinado em células Vero, tendo como desafio o vírus da encefalomiocardite de camundongo ou o vírus Sindbis.

A concentração por diálise contra pressão negativa, com as preparações em pH 2, mostrou recuperações de IFN acima de 50%. O método, apesar de bastante lento, foi considerado conveniente para pequenos volumes (até 100 ml).

A diálise contra substância higroscópica ("Aquacide") na qual a água das preparações é retirada por substância colocada externamente à membrana de diálise foi satisfatório, permitindo concentrações rápidas, de 6 a 10 vezes, com recuperações acima de 50%, sobretudo se o material fosse dialisado posteriormente em água acidulada.

A filtração molecular utilizando membranas Millipore PSAC ou PTGC e Amicon UM 2 não ofereceu resultados reproduzíveis.

A liofilização de preparações concentradas previamente pela precipitação com ácido tricloroacético permitiu a concentração sem perdas do IFN-MA.

Palavras-chave: interferon, concentração, métodos físicos.

INTRODUÇÃO

Os interferons (IFNs) são proteínas induzidas por vírus e outros estímulos em células de vertebrados. Estas proteínas, por alterações na superfície celular e ativação de genes celulares, promovem resistência antivírica, inibição da multiplicação celu-

lar, imunomodulação e outros fenômenos (20).

Os interferons, pelas suas atividades antivírica e anticelular têm sido empregados terapêuticamente em viroses e cânceres (17, 19) e, para sua produção industrial, têm sido utilizados leucócitos de sangue periférico (4), fibroblastos de pele humana (3), células tumorais humanas (21) e IFNs

Laboratório de Vírus — Departamento de Microbiologia — Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas Gerais

1 - Endereço atual:

Laboratório Central de Saúde Pública — Departamento Autônomo de Saúde Pública — Florianópolis — SC

Correspondência para Romain Rolland Golgher

Laboratório de Vírus — Departamento de Microbiologia — Instituto de Ciências Biológicas

— Universidade Federal de Minas Gerais — CP. 2486 — Av. Antonio Carlos, 6627 — 30.161 - Belo Horizonte, MG.

produzidos por técnicas de DNA recombinante, especialmente em bactérias (10).

Uma fonte alternativa de células humanas para a produção de IFN é o âmnio (7). O tecido é parte integrante da placenta, matéria-prima de fácil obtenção e o processo de produção é simples e de baixo custo (14), possibilitando sua utilização em ensaios terapêuticos. Todavia, as atividades biológicas de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA) foram pouco investigadas. Para estas finalidades, são necessárias preparações purificadas (8) e, como a atividade inicial destas é relativamente baixa (14) torna-se indispensável primeiramente concentrar este IFN para tornar possível a sua purificação.

Neste trabalho, diversos métodos físicos de concentração de IFN-MA foram estudados para possibilitar sua posterior purificação, com o objetivo de esclarecer suas várias atividades biológicas e testar o seu emprego clínico.

MATERIAL E MÉTODOS

Interferon

A produção foi realizada conforme detalhado por Kroon et al (14). Ânrios foram retirados, cortados, lavados em solução salina de Hanks (SSH) e infectados com vírus da doença de Newcastle, na concentração de 2×10^8 unidades infectantes (EID 50) por ml, numa quantidade de 0,9 ml/g de tecido. Transcorrida uma hora a 37°C , o excesso de vírus foi retirado e então acrescentados 6 ml de meio de Eagle (6) por grama de tecido, contendo diferentes concentrações de soro de carneiro. Os fragmentos de tecido foram reincubados por mais uma hora, a seguir o meio foi drenado e iniciou-se a indução propriamente dita, com adição de vírus não-diluído (2×10^9 EID 50/ml) ao volume referido. Decorridas duas horas a 37°C , o excesso de vírus foi removido e aos fragmentos de tecido novamente acrescentado meio de Eagle. A reincubação foi feita a 37°C e, após 24 horas, o sobrenadante foi drenado, o meio renovado e uma segunda coleta realizada após 48 horas.

Os estoques foram preparados a partir de IFN com e sem soro, sendo seu pH acertado para pH 7 ou pH 2 e mantidos a -70°C . Para uso, os estoques de IFN-MA, logo após o descongelamento, permaneceram a 4°C por 18 a 24 h, em pH 2. Alíquotas foram irradiadas com luz ultravioleta usando lâmpada germicida de 15W ("General Electric") durante 2 minutos, a uma distância de 20 cm e

conservados a -20°C até a titulação.

Para titulação (9), alíquotas das amostras previamente irradiadas e estocadas foram diluídas em placas de microtécnica de 96 câmaras utilizando meio 199 com 5% de soro de carneiro. Células Vero foram acrescentadas em concentração de 40 a 60 mil células por câmara e as placas incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após 24 horas, o meio foi drenado, sendo adicionados vírus Sindbis ou da encefalomiocardite de camundongo (EMC). As placas foram reincubadas e a leitura do teste realizada quando o controle de vírus apresentava efeito citopático de 75 a 100%. O título do IFN foi expresso pelo inverso da diluição que reduziu em 50% o efeito citopático. O coeficiente de variação de um interferon padrão interno foi de 45% para o desafio com o vírus EMC e de 46% para os ensaios com o vírus Sindbis. Em todas as titulações foi utilizado um padrão interno de IFN, sendo os resultados dos experimentos ajustados de acordo com a média dos títulos deste padrão.

O padrão internacional de interferon humano ("Research Standard B, 69/19"), foi titulado pelo método descrito acima e foi verificado que cada unidade, em nosso sistema de titulação, equivale a aproximadamente 2,9 unidades quando usado o vírus Sindbis e cerca de 2,7 unidades quando usado o vírus EMC como desafio.

Dosagem de proteínas

Nos experimentos a dosagem de proteínas foi realizada pelo método de Lowry et al (15) ou sua modificação (11), utilizando-se albumina plasmática bovina cristalizada como padrão.

Para cada dosagem foi utilizada uma solução com quantidade conhecida de proteína que representava o ponto médio da curva de calibração.

Concentração

Diálise contra pressão negativa - Preparações sem soro em pH 2 foram colocadas num tubo de diálise (diâmetro de 1/4 de polegada, Thomas Scientific, Filadélfia, EUA), mantido no interior de um frasco de Kitasato, com vácuo constante de 1 a 2 mm de Hg, sendo o sistema conservado a 4°C . No final da concentração, o vácuo foi desfeito, o material retirado e o tubo de diálise lavado com SSH.

Diálise contra substância higroscópica - O "aquacide" é produto da Calbiochem, La Jolla, Califórnia, EUA e foi cedido pelo Dr. Kurt Paucker da Filadélfia, Pensilvânia, EUA. O IFN sem soro e em pH 2 foi colocado dentro de um tubo de diálise

(diâmetro de 5/8 de polegadas), recoberto com "aquacide" e envolto por papel alumínio e mantido à temperatura ambiente. Em intervalos fixos de uma hora, o "aquacide" hidratado foi substituído e a redução do volume verificada. Quando a medida da redução estava próxima à desejada, a substituição do "aquacide" foi feita em intervalos de 15 minutos. Ao final da concentração, a preparação foi dividida em duas alíquotas e cada uma dialisada contra água destilada ou salina tamponada (PBS - pH 7,2; 0,15 M de cloreto; 0,01M de fosfato).

Filtração Molecular

As preparações de IFN sem soro em pH 2 foram centrifugadas a 3000xg durante 20 minutos, a 4°C, ou pré-filtradas (filtros Millipore 1,2 µm; 0,8 µm; 0,45 µm. O volume inicial foi colocado, através de pressão (2 a 4 kgf/m²) com N 2 gasoso, em filtro Millipore de 25 mm de diâmetro, contendo membranas Millipore PSAC ou Amicon UM-2, que retém substâncias com peso molecular maior que 1000 e Millipore PTGC, que retém substâncias com peso molecular até 10.000. O material permaneceu com agitação suave e constante em temperatura ambiental até redução de 6 a 9 vezes do volume inicial.

Liofilização

Amostras de IFN com soro e em pH 2,0 foram precipitadas através da adição de ácido tricloroacético (TCA) a 50%, a seguir foram ressuspensas e dialisadas em tampão cloreto 0,06 M pH 2,0 e submetidas à liofilização. O processo foi realizado em liofilizador Virtis (modelo 902-24-1), com temperatura oscilando entre -25 a -30°C durante 24 h, com vácuo de 50 µm de Hg. O material foi então ressuspensão num volume mínimo de tampão cloreto 0,06M pH 2 e dialisado contra o mesmo tampão, com agitação suave e constante a 4°C.

RESULTADOS

Diálise contra pressão negativa

Nas preparações de IFN sem soro e em pH 2, o fluxo foi de aproximadamente 100 ml entre 18 e 24 horas, sendo obtidas boas recuperações da atividade biológica em relação à amostra original, com variações de 56 a 57% em quatro experimentos (Tabela 1). Apesar das recuperações obtidas com IFN em pH 2, a ultrafiltração de grandes volumes não foi

TABELA 1 – Concentração de interferon humano de membranas amnióticas pela diálise contra pressão negativa^a

Experiência	Amostra	Volume em ml	Interferon		Recuperação %
			Unidades por ml	Totais	
A	Original	100	800	80.000	100
	Concentrado	12,7	4.000	50.800	64
B	Original	100	1.600	160.000	100
	Concentrado	11,2	8.000	89.600	56
C	Original	150	150	22.500	100
	Concentrado	21	800	16.800	75
D	Original	142	200	28.400	100
	Concentrado	18	1.000	18.00	63

a. Interferon sem o soro em pH 2 foi colocado num tubo de diálise e concentrado sob vácuo constante de 1 a 2 mm de Hg, permanecendo 18 a 24 horas a 4°C.

um bom método, devido à lentidão do processo. Os resultados obtidos com preparações em pH 7, em oito experimentos foram muito variáveis. Alguns apresentaram recuperação de até 100% e outros de apenas 10%, permanecendo a maioria em índices abaixo de 50% (dados não mostrados).

Na diálise contra substância higroscópica ("aquacide") a concentração de IFN sem soro e em pH 2, num volume inicial de 50 a 60 ml foi reduzida aproximadamente seis vezes num período de quatro a cinco horas à temperatura ambiente. De acordo com os resultados mostrados na Tabela 2, a diálise contra PBS mostrou recuperações de 38, 55 e 91%, sendo que, quando utilizada água destilada em pH 5, foram obtidos valores respectivos de 59, 60 e 64%. Este processo, lento, também foi adequado apenas para a concentração de pequenos volumes de IFN.

Filtração molecular

Os resultados não foram reproduzíveis. Em dois experimentos realizados com preparações em pH 7, recuperou-se 130 e 17% da atividade biológica, com membranas Millipore PSAC e apenas 40% com membranas PTGC. Testes utilizando membranas PSAC e IFN em pH 2 apresentaram recuperações de 10 a 95%, sendo que, em outros casos, foram recuperados 41% no filtrado e menos de 3% da atividade no material concentrado. Experimentos onde a membrana permaneceu imersa em albumina humana, ou quando o processo foi realizado sem agitação, não ofereceram bons resultados (dados não mostrados).

TABELA 2 – Concentração de interferon humano d' membranas amnióticas pelo uso do "aquacide"^(a)

Experiência	Amostra	Volume em ml	Diálise	Interferon		Recuperação %
				Unidades por ml	Totais	
A	Original	30 ^(b)	PBS água destilada	80	2.400	100
	Concentrado ^(c)	4,6		200	920	38
		5,7		250	1.425	59
B	Original	25	PBS água destilada	240	6.000	100
	Concentrado	4,1		800	3.280	55
		4,5		800	3.600	60
C	Original	25	PBS água destilada	240	6.000	100
	Concentrado	3,4		1.600	5.440	91
		4,8		800	3.840	64

a. Interferon sem soro em pH 2 foi colocado em tubo de diálise e concentrado em temperatura ambiente durante quatro horas.

b. O volume original foi reduzido à metade como medida da correção dos resultados finais.

c. Dividido em duas alíquotas, cada uma dialisada contra 400 vezes o volume de água destilada pH 5 ou PBS (salina tamponada pH 7,2; cloreto 0,15 M; fosfato 0,01 M).

TABELA 3 – Concentração de interferon humano de membranas amnióticas pela liofilização

Experiência	Amostra	Volume em ml	Proteína total mg (%)	Interferon		Atividade Específica ^(a)
				Unidades Totais	Recuperação %	
A	Original	30 ^(b)	159(100)	240.000	100	1.509
	Concentrado	6,5 ^(c)	193(121)	312.000	130	1.619
B	Original	30	573(100)	240.000	100	419
	Concentrado	7,8	415(72)	249.600	104	600
C	Original	30	573(100)	240.000	100	419
	Concentrado	7,2	413(72)	288.000	120	698

a. Unidades de interferon por mg de proteína.

b. Interferon com soro em pH 2 foi previamente concentrado com ácido tricloroacético (concentração final de 10%) e o precipitado ressuspenso e dializado contra tampão cloreto 0,06M pH 2

c. As preparações foram liofilizadas e o volume do concentrado corresponde ao obtido após ressuspenção e diálise contra a solução tampão.

Testes com membrana Amicon UM-2 e IFN em pH2, apresentaram resultados também variáveis, semelhantes aos descritos para membranas Millipore.

Liofilização

As recuperações de IFN, mostradas na Tabela 3, foram de 130, 104 e 120%. O percentual de recuperação acima de 100% explica-se pelo erro experimental na titulação do IFN (ver Material e Métodos). Este processo de concentração foi rápido, de pouco manuseio e eficiente, sendo que sua utilização após a precipitação com TCA permitiu reduzir grandes volumes sem perda de atividade biológica.

DISCUSSÃO

Os resultados da diálise contra pressão negativa, descritos na Tabela 1, mostram que, apesar de pequenas perdas, preparações de IFN sem soro podem ser concentradas por este método, conforme descrito para outros IFNs (2, 12). Foi um processo demorado, com duração de 24 a 36 horas para os volumes empregados. Ao final deste período, houve necessidade de se lavar o tubo de diálise com SSH, devido à adsorção do IFN ao tubo, relatada também para IFN humano (16) e murino (13).

A diálise contra pressão negativa ("aquacide"), processo com o qual foram obtidos bons resultados

(Tabela 2), por ser lento, deverá ser utilizado apenas para concentrar pequenos volumes. Perdas por adsorção ao tubo de diálise parecem não ter ocorrido, talvez pelo curto espaço de tempo que durou a concentração, cerca de quatro horas para os volumes utilizados. O uso de "aquacide" foi descrito na literatura por Paucker et al (18) que concentraram frações de Hu-IFN-alfa, após serem passadas por coluna de cromatografia de afinidade.

Com a filtração molecular, nossos resultados não permitiram a reprodução dos dados descritos para IFN murino (13) e IFN humano alfa e beta (1). Algumas vezes, os dados podiam ser explicados por ruptura visível da membrana, enquanto em outras situações, mesmo com a adsorção prévia das membranas com soro de carneiro, polivinilpirrolidona, albumina bovina ou gama globulina bovina, não foi possível recuperar uma atividade biológica considerável no material concentrado.

Dos métodos físicos utilizados, a liofilização foi a que apresentou os melhores resultados (Tabela 3), sendo que as pequenas elevações no número de unidades totais estão dentro do erro da titulação, que é de aproximadamente 50%. O aumento da atividade específica em decorrência da menor recuperação de proteínas, pode estar relacionado com a adsorção das mesmas aos frascos onde o IFN foi liofilizado e ressuspensão. Outros IFNs quando concentrados por este método, não sofreram queda apreciável de título como, por exemplo, IFNs humanos (1) ou bovino (5). Este processo foi utilizado após precipitação do interferon com TCA e permitiu concentrar grandes volumes em pouco tempo, sem perda de título, sendo o método físico de escolha para concentrar as preparações de IFN-MA contendo soro.

Quanto ao IFN sem soro, os métodos de diálise contra pressão negativa ou substância higroscópica podem ser utilizados para pequenos volumes. Para o método de filtração molecular há necessidade de testes com membranas de outras constituições químicas.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Bernadete de Jesus Martins e a João Rodrigues dos Santos pelos serviços auxiliares no Laboratório e a Angela Sana Lopes pela datilografia.

Este trabalho contou com suporte financeiro da FINEP (Convênios 324/CT e B/39/79/253/00/00 com o Departamento de Microbiologia), CNPq e CAPES.

SUMMARY

The concentration of the human amniotic membrane interferon: I - Physical methods.

The concentration of preparations of human amniotic membrane interferon (IFN-MA) by physical methods was investigated. Preparations were obtained from amnions infected with Newcastle disease virus. Their titers (in antiviral activity) were determined in a Vero cell-encephalomyocarditis or Sindbis virus system.

The concentration by dialysis under negative pressure was done in a tube held in a Kitasato flask with the preparations in pH 2.0. This procedure resulted in IFN recoveries above 50%. This method was considered to be convenient for small volumes - up to 100 ml - but very slow.

With "aquacide", where water is removed from the material in a dialysis tube by a hygroscopic substance, concentration was satisfactory for small volumes, allowing a decrease in volume of 6 to 10 times in hours, and recoveries above 50%, specially if materials were dialysed after concentration in acidulated water.

Molecular filtration did not show reproducible results when Millipore PSAC, PTGC or Amicon UM 2 membranes were used.

Concentration of IFN-MA with total recovery of activity was possible by the precipitation of preparations with trichloroacetic acid and lyophilization after dialysis.

Key Words: interferon, physical methods, concentration.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anfinsen, C.B.; Bose, S.; Corley, L. & Gurari-Rotman, D. Partial purification of human interferon by affinity chromatography. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71: 3139-3142, 1974.
2. Berman, B. & Vilcek, J. - Cellular binding characteristics of human interferon. *Virology*, 57: 378-386, 1974.
3. Billiau, A.; Joniau, M. & de Somer, P. - Mass production of human interferon in diploid cells stimulated by poly I: C. *J. Gen. Virol.*, 19: 1-8, 1973.
4. Cantell, K. & Hirvonen, S. - Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. *Tex. Rep. Biol. Med.*, 35: 138-141, 1977.
5. Davies, A. - The partial purification of calf interferon. *Biochem. J.*, 90: 29 P, 1964.
6. Eagle, H. - Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. *Science*, 130: 432, 1959.
7. Falcoff, E.; Falcoff, R.; Fournier, F. & Chany, C. - Production en masse, purification partielle et caractérisa-

- tion d'un interferon destiné a des essais therapeutiques humains. *Ann. Inst. Pasteur*, Paris, **111**: 562-584, 1966.
8. Fantès, K.H. - Interferon: purification and physico-chemical aspects. *J. Gen. Physiol*, **56**: 113-133s, 1970.
 9. Ferreira, P.C.P.; Peixoto, M.L.P.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. - Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J. Clin. Microbiol.*, **9**: 471-475, 1979.
 10. Goeddel, D.V.; Yelverton, E.; Ulrich, A.; Heyneker, H.L.; Mozzari, G.; Holmes, W.; Seeburg, P.H.; Dull, R.; May, L.; Stebbing, N.; Crea, R.; Maeda, S.; McCandliss, R.; Sloma, A.; Tabor, J.M.; Gross, M.; Familletti, P.C. & Pestka, S. - Human leucocyte interferon produced in *E. coli* is biologically active. *Nature*, **287**: 411-416, 1980.
 11. Hartree, E.F. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.*, **48**:422-427, 1972.
 12. Ho, M.; Nash, C.; Morgan, C.W.; Armstrong, J.A.; Carroll, R.G.; Postic, B. - Interferon administered in the cerebrospinal space and its effect on rabies in rabbits. *Infect. Immun.*, **9**: 286-293, 1974.
 13. Knight Jr., E. - Heterogeneity of purified mouse interferon. *J. Biol. Chem.*, **250**: 4139-4144, 1975.
 14. Kroon, E.G.; Novo, M.A.S.; Ferreira, P.C.P. & Golgher, R.R. - A produção de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA). *Rev. Microbiol.*, **21**: 121-126, 1990.
 15. Lowry, D.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R. J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
 16. Merigan, T.C.; Gregory, D.F. & Petralli, J.K. - Physical properties of human interferon prepared "in vitro" and "in vivo". *Virology*, **29**: 515-522, 1966.
 17. Oldham, R.K. - Biologicals and biological response modifiers: new strategies for clinical trials. *In: Interferon 4: in vivo and chemical studies*. Finter, N.B. e Oldham, R.K. ed. Elsevier, Amsterdam p. 235-249, 1985.
 18. Paucker, K.; Dalton, B.J.; Torma, E.T. & Ogburn, C.A. - Biological properties of human leukocyte interferon componentes. *J. Gen. Virol.*, **35**: 341-351, 1977.
 19. Scott, G.J. & Tyrrell, D.A.J. - Antiviral effects of interferon in man. *In: Finter, N.B. & Oldham, R.K. ed. Interferon 4. In vivo and clinical studies*. Elsevier, Amsterdam, p. 181-215, 1985.
 20. Weissman, C. & Weber, N. - The interferon genes. *Prog. Nuc. Acid. Res. Mol. Biol.*, **33**: 251-299, 1986.
 21. Zoon, K.G. & Buckler, C.E. - Large scale production of human interferon in lymphoblastoid cells. *Tex. Rep. Biol. Med.*, **35**: 145-149, 1977.

Recebido para publicação em 2/10/90.

A CONCENTRAÇÃO DE INTERFERON HUMANO DE MEMBRANAS AMNIÓTICAS: II - MÉTODOS QUÍMICOS

Luiz Alberto Peregrino Ferreira¹
Paulo César Peregrino Ferreira
Erna Geessien Kroon
Cássia Gonzaga
João Rodrigues dos Santos
Romain Rolland Golgher

RESUMO

Foi investigada a concentração do interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA) por precipitação através de métodos químicos.

O IFN-MA foi produzido em âmnios infectados com o vírus da doença de Newcastle em meio contendo diferentes concentrações de soro. A atividade anti-vírica das preparações foi titulada em células Vero infectadas com o vírus da encefalomiocardite de camundongo ou o vírus Sindbis.

A precipitação de IFN-MA contendo 2% de soro com tiocianato de potássio e extração com etanol ou salina tamponada com fosfato resultou em recuperações máximas de 31% de atividade do IFN-MA, consideradas baixas. Empregando-se sulfato de amônio em preparações com 1% de soro, pode-se recuperar quantidades acima de 60%. O método mais adequado de concentração do IFN-MA contendo 1% de soro foi a precipitação com ácido tricloroacético e ressuspensão do material com tampão cloreto pH 2, com recuperações em torno de 100% da atividade.

As tentativas de concentrar IFN-MA preparado sem soro por estes métodos não foram eficazes porque o baixo conteúdo protéico das preparações não permitiu uma precipitação adequada.

Palavras-chave: interferon, concentração, métodos químicos.

INTRODUÇÃO

Para a investigação das características físico-químicas, atividades biológicas e ensaios clínicos dos interferons (IFN), a sua purificação é essencial (2). Em virtude da sua baixa atividade nos preparados brutos (1, 7) deve-se concentrá-los a um

grau adequado, sem perda significativa da atividade biológica, como passo inicial dos processos de purificação.

No primeiro artigo desta série, focalizamos os métodos físicos de concentração do interferon humano de membrana amniótica (IFN-MA) e aqui são analisados métodos químicos por precipitação.

Laboratório de Vírus — Departamento de Microbiologia; Instituto de Ciências Biológicas; Universidade Federal de Minas Gerais
1. Endereço atual: Departamento de Análises Clínicas; Centro de Ciências da Saúde; Universidade Federal de Santa Catarina; Correspondência para: Romain Rolland Golgher — Laboratório de Vírus — Departamento de Microbiologia — Instituto de Ciências Biológicas — Universidade Federal de Minas Gerais — CP. 2486, Av. Antonio Carlos, 6627 — 30.161 — Belo Horizonte, MG.

MATERIAL E MÉTODOS

Interferon

Para a produção de IFN-MA (7), âmnios foram separados de placentas, fragmentados e infectados com vírus da doença de Newcastle. O meio de cultura contendo concentrações variadas de soro de carneiro e antibióticos foi colhido depois de 24 e 48 h de incubação. A titulação da atividade anti-vírica de IFN foi feita em células Vero tendo como desafio vírus da encefalomiocardite de camundongo ou o vírus Sindbis em microtécnica (3), utilizando-se sempre um padrão interno, contra o qual os títulos de IFN foram ajustados.

Dosagem de proteína

A dosagem foi realizada pelo método de Lowry (8) ou sua modificação (5).

Concentração

Tiocianato de potássio – Às preparações de IFN contendo 2% de soro e em pH 3,5 foi adicionado KSCN sólido para uma concentração final de 0,5M permanecendo a 4°C com agitação branda, até sua completa dissolução. O material foi então centrifugado a 16.000 xg durante 10 minutos a 4°C e o precipitado ressuspenso (1/20 do volume original) sucessivas vezes em etanol 94%, pH 4,2 ou em salina tamponada (PBS).

Tanto o sobrenadante quanto o precipitado foram, a seguir, dialisados (20 vezes o volume) contra PBS, tampão cloreto pH 2 e novamente PBS.

Sulfato de amônio – As preparações de IFN em pH 2 e contendo 1% de soro foram inicialmente centrifugadas a 3000 xg durante 10 minutos a 4°C. A seguir foi adicionado sulfato de amônio sólido para uma concentração final de 60% (p/v), permanecendo com agitação branda constante durante três horas a 4°C. A solução foi então centrifugada a 8000xg durante 30 minutos a 4°C e o precipitado ressuspenso em volume mínimo de água destilada pH 6,0 e dialisado contra o mesmo solvente.

Ácido tricloroacético (TCA) – As preparações de IFN em pH 2 e com 1% de soro foram centrifugadas a 3000xg durante 20 minutos a 4°C. A seguir foi adicionada uma solução de TCA 50% até uma concentração final de 10% (v/v), permanecendo a preparação em agitação branda durante uma hora a 4°C. Após centrifugação do material a 8000xg durante 30 minutos a 4°C, o precipitado obtido foi ressuspenso em volume mínimo e dialisado com tampão cloreto pH 2.

RESULTADOS

Tiocianato de potássio – Em diversos experimentos, após adição de KSCN sólido e obtenção do precipitado, o IFN foi extraído três vezes com etanol a 94% em pH 4,2 (Tabela 1).

Após a primeira extração na qual foram recuperados 24% da atividade inicial, a preparação foi novamente centrifugada e o precipitado outra vez tratado com etanol na segunda extração, onde foram recuperados apenas 7% da atividade original. Na terceira extração foram obtidos valores inferiores a 4% do título original de IFN.

As extrações, após diálises consecutivas contra PBS, tampão cloreto e PBS, foram misturadas e foi feita uma reprecipitação com KSCN 0,5M. Do precipitado foi realizada nova extração do IFN com etanol e a recuperação foi de 7% em relação à amostra original. No sobrenadante respectivo permaneceram apenas 2% de atividade.

Também foi utilizado PBS para extrair o IFN após a adição de KSCN (Tabela 2). A amostra original foi dividida em alíquotas e estas foram ressuspensas em PBS (com recuperação de 31% de atividade) ou etanol pH 4,2 (com recuperação de 24% de atividade). O sobrenadante continha 15% do IFN original. O material extraído com etanol após diálise em PBS, tampão cloreto e PBS, foi reprecipitado e após nova ressuspensão com PBS, 31% da atividade original foi recuperada,

TABELA 1 - Concentração de interferon humano de membranas Amnióticas pela precipitação com KSCN e extração com etanol (a)

Material	Volume em ml	Interferon		
		Unidades por ml Totais	Total	Recuperação %
Original	780	270	210.600	100
Precipitação				
1a. Extração	48 (b)	1.070	51.360	24
2a. Extração	54	270	14.580	7
3a. Extração	57	<130	< 7.410	< 4
1º Sobrenadante	780	< 70	<54.600	<26
Reprecipitado				
Extração	13	1.070	13.910	7
2º Sobrenadante	139	30	4.170	2

- (a) Interferon com 2% de soro foi levado a pH 3,5 antes da adição de kscn (concentração final de 0,5 m). Após coleta de alíquotas para titulação de IFN e dosagem de proteínas, as extrações foram misturadas e reprecipitadas com KSCN.
- (b) O volume das extrações foi obtido após ressuspensão em etanol 94% e diálise contra PBS (salina tamponada pH 7,2; cloreto 0,15m; fosfato 0,01m

sendo que o sobrenadante apresentava valores menores que 5%.

Outras recuperações menores que 20% foram obtidas em apenas uma ressuspensão com PBS. Em preparações sem soro foram recuperados de 4 a 9% de IFN com etanol como solvente para extração; 11 a

23% com PBS; 8% com água destilada pH 6,0; 1 a 22% com solução Tris-salina-EDTA (TSE-pH 7,2; 0,01M; 0,15M; 0,001M) (dados não mostrados).

Em algumas preparações, com ou sem soro, não houve precipitado após adição do KSCN. Estes dados podem ser explicados pelo fato de que a concentração por adição de sais envolve precipitação de proteínas e co-precipitação de IFN. Deste modo, caso as preparações não contenham proteínas suficientes para carrear o IFN, não haverá sua co-precipitação.

Sulfato de amônio – As recuperações de atividade biológica mostradas na Tabela 3 foram de 64, 122 e 85%, sendo que no sobrenadante foram obtidos valores menores que 1% de recuperação do IFN original. O número de unidades de IFN por ml aumentou de oito a treze vezes.

De experimentos realizados com IFN em pH 7 foram recuperados 15% quando solução salina 0,9% pH 4,2 ou PBS foram utilizadas para extração sendo que, em ambos os casos, a diálise foi realizada com PBS. Em outros testes, após adição de uma solução de sulfato de amônio 100% saturada e tamponada com hidroximetil amino metano 1M (Tris), obtiveram-se recuperações de 3 a 28% após ressuspensão com TSE e diálise em PBS (dados não mostrados).

A recuperação de amostras em pH 2, após adição do sulfato de amônio, variou com a composição do solvente de extração. Assim, quando se

TABELA 2 - Concentração de interferon humano de membranas Amnióticas pela precepitação com KSCN e extração com etanol e pbs^(a)

Material	Volume Em ml	Interferon		
		Unidades Por ml	Total	Recuperação %
Original	630	130	81.900	100
Precipitação				
Extração com PBS	94 ^(b)	270	25.380	31
Extração com Etanol	150	130	19.500	24
1º Sobrenadante	630	20	12.600	15
Reprecipitado				
Extração com PBS	12	2.130	25.560	31
2º Sobrenadante	144	< 30	<4.320	<5

(a) Ao interferon com 2% de soro e em pH 3,5 foi adicionado KSCN (concentração final de 0,5 M). A amostra foi dividida em duas alíquotas, uma extraída com PBS (salina tamponada pH 7,2; cloreto 0,15M; fosfato 0,01 M) e a outra com etanol 94% pH 4,2. O material extraído com etanol foi reprecipitado.

(b) O volume das extrações foi obtido após diálise contra PBS, e corrigidos para o total original utilizado.

TABELA 3 - Concentração de interferon humano de membranas amnióticas pela precipitação com sulfato de amônio e ressuspensão em água destilada^(a)

Experiência ^(b)	Amostra	Volume Em ml	Proteína Total mg (%)	Interferon		Atividade Específica ^(c)
				Unidades Totais	Recuperação (%)	
A	Original	60	28 (100)	240.000	100	8.715
	Precipitado	4,8 ^(d)	19 (68)	153.600	64	7.909
	Sobrenadante	70	2 (7)	<700	<1	<455
B	Original	50	SD ^(e)	200.000	100	SD
	Precipitado	5,4	SD	243.000	122	SD
	Sobrenadante	56	<1	<500	<1	<452
C	Original	275	49 (100)	330.000	100	6.707
	Precipitado	17,6	SD	281.600	85	SD
	Sobrenadante	315	2 (4)	<1.575	1	<516

(a) Interferon com 1% de soro e em pH 2 foi adicionado de sulfato de amônio (concentração final de 60% p/v).

(b) A e B são amostras de uma mesma preparação.

(c) Unidades de interferon por mg de proteína.

(d) Após ressuspensão e diálise contra água destilada pH 6,0.

(e) SD = sem dados.

TABELA 4 - Concentração de interferon humano de membranas amnióticas pela precipitação com ácido do tricloroacético (TCA) e ressuspensão em tampão cloreto pH 2^(a)

Experiên- cia ^(b)	Amostra	Volume Em ml	Proteína		Interferon		Atividade Específica ^(c)
			Total mg (%)	Unidades Totais	Recuperação (%)		
A	Original	60	35	48.000	100	1.371	
	Precipitado ^(d)	4,5	SD ^(e)	72.000	150	SD	
	Sobrenadante	71	SD	< 3.550	< 7	SD	
B	Original	60	41 (100)	72.000	100	1.756	
	Precipitado	4,5	36 (88)	54.000	75	1.500	
	Sobrenadante	71	0,78 (1,9)	< 3.550	< 5	< 4.551	
C	Original	500	145 (100)	3,0 X 105	100	2.069	
	Precipitado	33,5	177 (122)	2,7 X 105	90	1.514	
	Sobrenadante	590	17 (12)	< 0,3 X 105	< 10	< 1.735	
D	Original	3.780	5.330 (100)	4,5 X 106	100	844	
	Precipitado	230	4.393 (82)	8,2 X 106	184	1.867	
	Sobrenadante	4.400	264 (5)	< 0,22 X 106	< 4.8	< 833	

(a) interferon com 1% de soro em pH 2 foi adicionado do ácido (concentração final de 10%).

(b) A e B são amostras de uma mesma preparação. Outras preparações foram utilizadas em C e D.

(c) Unidades de Interferon por mg de proteína.

(d) Após ressuspensão e diálise contra tampão cloreto 0,06M pH 2.

(e) SD = sem dados.

usou água destilada em pH 6,5, a recuperação foi de 39 a 41%; com fosfato de potássio 0,05M, 15 e 24%; com fosfato de sódio 0,05 M, 15% e com PBS pH 6,0 de 50%. As diálises foram contra as respectivas soluções.

Em preparações sem soro não foi conseguida formação de precipitado, possivelmente devido ao mesmo fato sugerido para o KSCN.

Este método mostrou-se eficiente na precipitação e recuperação do IFN mesmo quando foi utilizado para concentrar grandes volumes.

Ácido tricloroacético – Após precipitação com TCA, ressuspensão com tampão cloreto e diálise contra o mesmo tampão, foram obtidos 150, 75, 90 e 184% de recuperação da atividade do IFN original, de acordo com a Tabela 4. Nos sobrenadantes foram recuperados valores menores que 10% do título inicial. O número de unidades de IFN por ml aumentou em todos os casos de 10 a 30 vezes. A quantidade protéica recuperada foi de 88% no experimento B, 122% no C e 82% no D, sendo que os sobrenadantes continham quantidades iguais ou menores que 12%.

Na concentração de IFN sem soro e em pH 2, recuperou-se menos de 30% na atividade biológica inicial do precipitado formado com TCA (dados não mostrados).

DISCUSSÃO

Tiocianato de potássio – O método de concentração que utiliza KSCN é baseado na solubilidade do IFN em etanol acidificado (2) e sua insolubilidade em pH neutro (4). Os estudos mais importantes foram desenvolvidos com preparações derivadas de leucócitos humanos. Foi utilizado etanol acidificado para ressuspender o IFN precipitado, sendo posteriormente elevado o pH da solução, de maneira a se eliminarem globulinas e albumina, com conseqüente purificação.

Em nossos testes, cujos resultados estão nas Tabelas 1 e 2, o IFN não foi totalmente precipitado nem mesmo dissolvido em etanol acidificado ou PBS.

Sulfato de Amônio – de acordo com a Tabela 3, o sulfato de amônio precipitou praticamente todo o IFN, sendo possível recuperar a maior parte da atividade biológica e proteínas.

Resultados variáveis são descritos para interferons derivados de espécies distintas, entre estes, pode-se citar os dados obtidos com interferon humano (6, 9) e de rato (12).

Ácido tricloroacético (TCA) – Conforme a Tabela 4 foi o método químico de concentração mais eficiente, permitindo reduzir grandes volumes em pouco tempo e sem perdas conside-

ráveis de atividade, conforme também assinalado por Rubinstein *et al* (11) para o IFN humano alfa.

A recuperação de 184% (Tabela 4) poderia ser devida à alta acidez das amostras expostas a TCA (pH 1 a 1,5) que poderia provocar uma maior exposição de sítios ativos do IFN-MA (10).

Concluiu-se que para a concentração de IFN-MA contendo soro, o método mais adequado é a utilização de ácido tricloroacético, que permite o manuseio de grandes volumes, é de fácil manipulação e permite a recuperação total da atividade do IFN.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Bernadete de Jesus Martins e Maria Lúcia Trindade pelos serviços auxiliares no Laboratório e Angela Sana Lopes pela datilografia.

Este trabalho contou com suporte financeiro da FINEP (Convênios 324/CT e B/39/253/00/00 com o Departamento de Microbiologia), CNPq e CAPES.

SUMMARY

Concentration of the human amniotic membrane interferon: II. Chemical methods

The concentration of the human amniotic membrane interferon (IFN-MA) by chemical methods was investigated.

IFN-MA was produced by amnions infected with the Newcastle disease virus in medium containing various serum concentrations. Antiviral activity of the preparations was determined by a Vero cell-encephalomyocarditis virus or Sindbis virus system.

Potassium thiocyanate precipitation and ethanol or phosphate buffered saline (PBS) extraction of IFN-MA containing 2% serum resulted in low recoveries, 31% maximum. When ammonium sulphate was employed with preparations with 1% serum, recoveries were above 60%. Best results were obtained by precipitation of IFN-MA (1%

serum) with trichloroacetic acid and solubilization with chloride buffer. Recoveries with this method were around 100%.

Experiments trying to concentrate IFN-MA prepared without serum by these methods failed, because the low protein content of the preparations did not allow for a suitable precipitation.

Key Words: interferon, concentration, chemical methods.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cantell, K. & Hirvonen, S. - Preparation of human leukocyte interferon for clinical use. *Tex. Rep. Biol. Med.* **35**: 138-144, 1977.
2. Fantes, K.H. - Interferon: purification and physicochemical aspects. *J. Gen. Physiol.*, **56**: 113-133S, 1970.
3. Ferreira, P.C.P.; Peixoto, M.L.P.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. - Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J. Clin. Microbiol.*, **9**: 471-475, 1979.
4. Graff, S.; Kassel, R. & Kastner, O. - Interferon. *Trans. N.Y. Acad. Sci.*, **32**: 545-556, 1970.
5. Hartree, E.F. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* **48**: 422-427, 1972.
6. Knight, Jr. E. - Interferon: purification and initial characterization from human diploid cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **73**: 520-523, 1976.
7. Kroon, E.G.; Novo, M.A.S.; Ferreira, P.C.P. & Golgher, R. R. - A produção de interferon humano de membranas amnióticas (IFN-MA). *Rev. Microbiol.*, **21**: 121-126, 1990.
8. Lowry, Y.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. - Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275, 1951.
9. Merigan, T.C.; Gregory, D.F. & Petralli, J.K. - Physical properties of human interferon prepared "in vitro" and "in vivo". *Virology*, **29**: 515-522, 1966.
10. Mulkerrin, M.G.; Wetzel, R. - pH Dependence of the reversible and irreversible thermal denaturation of gamma interferons. *Biochemistry*, **28**: 6556-6561, 1989.
11. Rubinstein, M.; Rubinstein, S.; Familletti, P.C.; Miller, R.S.; Waldmann, A.A. & Pestka, S. - Human leukocyte interferon: production, purification to homogeneity and initial characterization. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**: 640-644, 1979.
12. Schelekens, K.; De Wilde, G.A. & Weimar, M. - Production and initial characterization of rat interferon. *J. Gen. Virol.*, **46**: 243-247, 1980.

Recebido para publicação em 2/10/90.

PURIFICATION OF HUMAN AMNIOTIC MEMBRANE INTERFERON BY AFFINITY CHROMATOGRAPHY

Cássia Gonzaga Pimenta
Paulo César Peregrino Ferreira
Luis Alberto Peregrino Ferreira¹
Romain Rolland Golgher

ABSTRACT

The purification of human amniotic membrane interferon was undertaken, to obtain purified preparation for its physicochemical characterization, study of biological activities and clinical trials. Interferon was produced in amniotic membranes infected with Newcastle disease or Sendai virus. Assay of antiviral activity was performed by a Vero cell-encephalomyocarditis virus system. The interferon preparations were concentrated by trichloroacetic acid precipitation and chromatographed in Blue-Sepharose, Concanavalin A-Sepharose and Sepharose linked to a tryptophan-tryptophan dipeptide or a tryptophan-tyrosine dipeptide. With Blue Sepharose, the optimal pH for interferon binding was 5.4. Batch application, showing 37,000 units of interferon bound per ml of gel, was more efficient than column application, where only 17,750 units per ml of gel were bound. Peak fractions showed a purification factor of 274 and 12% recovery of interferon with a total at 78% recovery and a purification factor of 69. With Concanavalin A-Sepharose, although the recovery was high (72 to 196%), the purification factor achieved was only 6.7; the trp-trp and trp-tyr dipeptide-Sepharose ligands showed a low binding of interferon, below 10,000 units per ml of gel.

Key Words: Purification/interferon/human/affinity chromatography.

INTRODUCTION

Interferon (IFNs) are proteins induced by viruses and other stimuli. By the activation of cellular genes and alterations in the cell surface, IFNs promote viral resistance, immunomodulation, inhibition of cell division and other phenomena (21). In human cells, antigenically different IFNs are produced, depending on the cell type and inducer; these IFNs are classified as alpha, beta and gamma

(23). Other human IFNs have been described, but have not been fully characterized (1, 2, 19, 24).

The purification of IFNs is essential for its physico-chemical characterization, for the study of its biological activities and for clinical applications. Usually a combination of methods is used, such as precipitation, chromatography - on exchange, gel filtration, affinity, reserve phase - isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis (5).

1. Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, ICB, UFMG, Caixa Postal 2486. 30.161 - Belo Horizonte, MG, Brasil.
Present address: Laboratório Central de Saúde Pública, DSP, Florianópolis, SC, Brasil.
Correspondence: Dr. Romain Rolland Golgher, Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia - Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. - CP.2486-30.161 - Belo Horizonte, MG - Brasil - Telefax: (031) 441-6482 - Fone (031) 441-8414

Human amniotic membrane interferon (IFN-AM) production was reported by Fournier *et al.* (11) and some of its properties were studied (3, 4). In our laboratory, investigations were carried out to discover the best conditions for the production of this IFN (16, 18) its concentration (6, 7) and preservation (L.A.P. Ferreira *et al.*, submitted).

Amniotic membranes are easily obtainable from human placentas and the production process of IFN-AM is cheap and simple, making possible its industrial production for clinical applications and also for investigations into its physico-chemical characteristics and biological activities. In this paper, several affinity chromatography ligands suggested by Ferreira *et al.* (9) were employed for the purification of IFN-AM.

MATERIAL AND METHODS

Production and titration of IFN-AM – The production of IFN-AM was done according to Kroon *et al.* (16). Amniotic membranes were separated from human placentas, washed and induced by Newcastle disease virus, Texas 2 strain, for 2 h. Culture medium was then added and harvested after 24 and 48 h of incubation at 37°C.

Titration of antiviral activity was performed in Vero cells infected with encephalomyocarditis virus in a microtechnique assay (10). The interest coefficient of variation was 40%. Each international unit of the Research Standard 69/19, MRC England corresponds to 2.5 laboratory units. In this paper, data are expressed in laboratory units.

Concentration of IFN-AM and preparations of concentrated IFN-AM – Media containing IFN-AM were centrifuged at 3,000 g, 4°C for 20 min. Supernatants received trichloroacetic acid to a final concentration of 5 or 10%. After one hour under gentle agitation, a pellet was obtained by centrifugation (8,000 g, 4°C, 30 min) resuspended and dialyzed against HCl-KCl buffer, 0.06M; pH 2. Aliquots were taken for IFN titration and protein determination (13) and the preparations were kept at -20°C.

Preparations A, B and C were obtained with Eagle minimum essential medium (MEM) containing 1 to 5% sheep serum; preparation D with Eagle basal medium containing 2% human plasma; preparations E and F, Scherer medium (49.5%), MEM (49.5%), human plasma (1%).

Chromatography – Buffers for equilibrating the ligands were: E0 buffers-pH 7.2 sodium phos-

phate 0.02M or pH 5.4, sodium citrate citric acid 0.02M, both containing 0.15M sodium chloride. E1 buffers-NaCl concentration was increased to 1M. E2 buffers-E1 buffers plus 50% ethylene glycol, v/v. Chromatography columns were used for all ligands. Batch preparations were also employed with Blue Sepharose. Other experimental conditions are made explicit in the Results section.

Succinylated tryptophan-tryptophan amino-hexyl Sepharose was prepared as described by Patrick (19) and tryptophan-tyrosine amino-hexyl Sepharose in accordance with Sulkowski *et al.* (22).

Other ligands were supplied by Pharmacia Fine Chemicals.

RESULTS

Blue-Sepharose – Preliminary tests were done by equilibrating, in columns, the ligand with phosphate buffered saline, pH 7.2. Proteins were washed off with E0 (32 to 50%) and E1 (about 60%); E0 eluates had practically no antiviral activity (data not shown). Thus, further experiments were performed using E1 as equilibrating buffer.

Several ethylene-glycol (EG) concentrations were tested in a discontinuous gradient - 10, 20, 30, 40 and 50% (v/v) in E2 buffer. Despite the fact that all the EG concentrations showed some IFN activity, the major portion (44%) was displaced only with 50% EG concentration. Therefore, further experiments were done using E1 and E2 with 50% EG. Results are summarized in Table 1. Total recoveries varied from 73 to 104%. However, IFN activity was also found in varying amounts in the E1 eluate (9 to 34%). By comparing the specific activities (IFN units per mg of protein) of the input material and E2 eluates, it was possible to purify the IFN 113 times and, in peak fractions, 400 times. The amount of IFN activity displaced by E2 buffer reached 17,750 units per ml of gel.

Due to the varying amounts of IFN displaced with the E1 buffer, the influence of pH was systematically investigated by using columns of one ml of Blue-Sepharose. Equilibrium buffer for pH 3 to 6 was citric acid-sodium citrate; for pH 6 to 7, sodium phosphate.

As shown in Fig. 1 panel A, most of the IFN activity was eluted by E2 buffer when the pH was 5 or 6, no matter the kind of buffer used. When smaller increases in pH were tried (Fig. 1, panel B), best results were obtained with pH 5.4.

TABLE 1 - Chromatography of the human amniotic interferon in Blue-Sepharose

Preparation	Applied	Interferon units X 10 ³ (%)			
		Recovered			Total
		E0	E1	E2	
A	10.8(100)	< 0.2(2)	2.4(22)	6.5(60)	9.1(84)
A	17.5(100)	< 0.2(1)	1.6(9)	16.9(94)	18.4(104)
B	216(100)	ND	50.5(23)	142(66)	192.5(89)
C	224(100)	ND	27(12)	136(61)	163(73)
D	141(100)	ND	48.2(34)	80.6(57)	128.8(91)

Conditions - E0-Saline buffered with phosphate 0.02M; pH 7.2. E1-E0 with NaCl 1M E2-E1 with 50% ethylene glycol. Column - 0.45 X 12.5 cm . Flow rate: 30-40 ml/h.
 ND - not done.

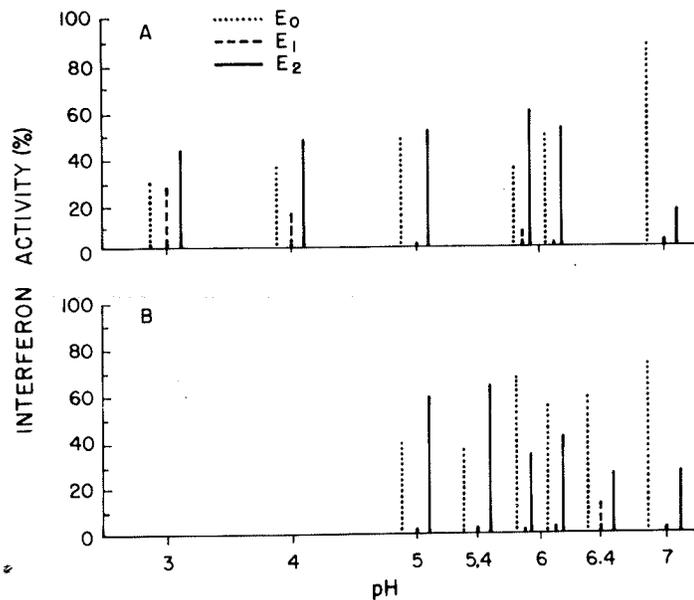


FIGURE 1 - Influence of pH on the binding of the human amniotic membrane interferon in Blue Sepharose. One ml columns of ligand were used. Columns were equilibrated with citric acid-citrate buffer, 0.02M for pH 3 to 6 and sodium phosphate buffer, 0.02M for pH 6 to 7. Elution was done, consecutively with E0 (equilibration buffer plus 0.15 NaCl), E1 (equilibration buffer plus 1M NaCl), E2(E1 buffer plus 50% (v/v) ethylene glycol).

The relative efficiency for IFN purification comparing column versus batch application was investigated. Results (Table 2) indicated that batch purification was better, yielding an increased amount of IFN eluted by E2 buffer, that is 37,500 IFN units per ml of gel. In another experiment, using the batch application (preparation F) the total recovery of IFN was 78% with a purification factor of 69; peak fractions showed 12% of recovered IFN units, and a purification factor of 274.

Concanavalin A-Sepharose (Con-A) - Two preliminary experiments were performed under conditions of different ionic strength (0.15 and 1M NaCl) and in the presence of alpha-methylmannoside (0.1M) and EG. Results demonstrated that the majority of IFN activity was eluted by buffers containing a mixture of the sugar derivative and EG, at pH 7.2; the total recovery was 72 and 196%.

Further experiments were done by equilibrating the ligand with E1 buffer and displacing the

TABLE 2 - Chromatography of the human amniotic interferon in Blue-Sepharose. Comparison of column versus batch application.

Type of application	Applied	Interferon units X 10 ⁻³ (%) per ml of gel (%)			Total
		Recovered			
		E0	E1	E2	
Column	32(100)	6.9(21.5)	6.9(21.5)	15.1(47)	28.9(90)
Batch	48(100)	6.4(13)	6.8(14)	37.5(75)	50.7(105)

Conditions: Buffers - E0 - citric acid-citrate 0.02M; pH 5.4; 0.15 M NaCl. E1 - citric acid-citrate 0.02M; pH 5.4; 1M NaCl. E2-E1 plus 10% ethylene-glicol (V/V)

Column - Preparation I (20 ml) was applied to a column of 0.9X12.5 cm. Flow rate - 35 ml/h. Fractions of 5 ml were collected. Room temperature.

Batch - Preparation I (40 ml) was mixed with 16 ml of gel and gently agitated for 72 h at 4°C. Elution was done at room temperature by centrifuging ligand beads at 100xg, for 10 min in the presence of 20 ml of buffer. Several fractions were obtained with each buffer.

IFN with E1 buffer containing 50% EG and 0.1M alpha-methyl-mannoside. Results showed that the vast majority (75 to 88%) of the contaminating proteins were not bound by the ligand and the maximum amount of IFN units retained per ml of gel was 56,000 in different experiments. The increase in specific activity-purification factor attained with this procedure reached only 6.7 (data not shown).

Other ligands - With Sepharose trp-trp, equilibrated at pH 7.2, total recovery of IFN activity was good (89 to 119%) but the binding capacity of the ligand was low-4,000 to 8,000 IFN units per ml of gel; trp-tyr Sepharose equilibrated at pH 7.2 showed also a low efficiency since only 6,000 to 9,000 IFN units per ml of gel were displaced by E1 and E2 (data not shown).

DISCUSSION

The purification of IFN-AM with Blue-Sepharose showed good results, as it was reported for human beta IFN (12, 14, 15). Exploring further the indications of Ferreira *et al.* (9), total recoveries of IFN-AM varied from 73 to 91%, with purification factors of 100 to 400 and the binding of IFN reaching 17,750 units per ml of gel (Table 1). IFN-AM hydrophobicity was favored at pH 5.4 (Fig.1) and batch application was easier to perform and more efficient, since 37,000 units per ml of gel were retained (Table 2), against 17,750 when a column was used. IFN-AM purified by this method could be instilled in rabbit's eyes for several days with no damage seen in slit lamp examination (N.O.Calixto, per-

sonal communication).

The preliminary data of Ferreira *et al.* (9) and the results reported by others on human beta IFN (17) indicated Con-A as a good ligand for the purification of IFN-AM; moreover, IFN-AM has a majority of its molecules composed of glycoproteins (Ferreira *et al.*, in preparation 20). In spite of this, the results obtained with Con-A were far from promising perhaps because the IFN-AM preparations contain more than 99.9% of contaminating proteins.

The hydrophobicity of the dipeptides trp-trp and trp-tyr linked to Sepharose was not sufficient to ascertain a good purification of IFN-AM.

However, with Blue-Sepharose, the hydrophobicity of the ligand was sufficient to provide a purified IFN-AM preparation compatible with topical applications in human eyes and to permit the investigation of its biological and chemical properties.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank João Rodrigues dos Santos, Maria Lúcia Trindade, Bernadete de Jesus Martins and Alex Fiorini de Carvalho, for excellent technical assistance, and Angela Sana Lopes and Claudina Bonfim for typing.

Work supported by the Fundo de Incentivo à Pesquisa Técnica e Científica do Banco do Brasil S.A. (FIPEC) and the Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP - grant B 76.81.237.00.00). C.G. and L.A.P.F. had scholarships from CNPq. RRG is a CNPq research fellow.

RESUMO

Purificação de interferon humano de membranas amnióticas por cromatografia de afinidade

A purificação do interferon humano de membranas amnióticas foi realizada para se obter preparações purificadas para sua caracterização físico-química, estudo de suas atividades biológicas e ensaios terapêuticos. O interferon foi produzido em membranas amnióticas infectadas com o vírus da doença de Newcastle ou o vírus Sendai. A determinação da atividade anti-vírica foi feita em células Vero infectadas com o vírus da encefalomiocardite de camundongo. As preparações de interferon foram concentradas por precipitação por ácido tricloroacético e cromatografadas em "Blue-Sepharose", Sepharose-concanavalina A, Sepharose ligada ao dipeptídeo triptofânio (trp)-triptofânio e ao dipeptídeo triptofânio-tirosina (tyr). Com a "Blue-Sepharose", o pH ótimo de ligação do interferon foi 5,4. A aplicação em batelada mostrou que foram ligadas 37.000 unidades de interferon por ml de gel sendo portanto, mais eficiente que a aplicação em coluna, na qual somente foram ligadas 17.750 unidades por ml de gel. As frações do pico de atividade foram purificadas 274 vezes, com 12% de recuperação do interferon em um experimento, com um total de 78% de recuperação e um fator de purificação de 69. Com a Sepharose-concanavalina A, embora a recuperação fosse alta (72 a 196%), o fator de purificação atingido foi de apenas 6,7; os ligantes Sepharose trp-trp e trp-tyr mostraram uma ligação baixa do interferon, menor que 10.000 unidades por ml de gel.

Palavras-chave: purificação, interferon, humano, cromatografia de afinidade.

REFERENCES

1. Adolf, G.R. - Antigenic structure of human interferon omega 1 (interferon alpha II 1): comparison with other human interferons. *J.Gen.Virol.*, 68:1669-1676, 1987.
2. Dianzani, F.; Dolei, A. & Di Marco, P. - A new type of human interferon produced by peripheral blood mononuclear cells treated by inhibitors of transcription. *J. Interf. Res.*, 6:43-50, 1986.
3. Duc-Goiran, P.; Galliot, B. & Chany, C. Studies on the virus - induced interferons produced by human amniotic membrane and white blood cells. *Arch. ges.Virusforsch.*, 34:232-243, 1971.
4. Duc-Goiran, P.; Robert-Galliot, B.; Chudzio, T. & Chany, C. Unusual human interferons produced by virus infected amniotic membranes. *Proc.Nat.Acad.Sci.USA*, 80: 2628-2631, 1983.
5. Fantes, K.H. - Purification and physico-chemical properties of interferons. In: Finter, NB (Editor). *Interferons and Interferon Inducers*. North-Holland, Amsterdam, p.171-200, 1973.
6. Ferreira, L.A.P.; Ferreira, P.C.P.; Pimenta, C.G. & Golgher, R.R. - A concentração de interferon humano de membranas amnióticas. I. Métodos físicos. Submitted.
7. Ferreira, L.A.P.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Trindade, M.L. & Golgher, R.R. - A concentração de interferon humano de membranas amnióticas: II. Métodos químicos. Submitted.
8. Ferreira, P.C.P. - *Propriedades da molécula de interferon de membrana amniótica humana*. PhD Thesis, UFRJ, Rio de Janeiro, 1987.
9. Ferreira, P.C.P.; Paucker, M.; Golgher, R.R. & Paucker, K. Affinity chromatography of primary human amnion interferon. *Arch.Virol.*, 68:27-33, 1981.
10. Ferreira, P.C.P.; Peixoto, M.L.P.; Silva, M.A.V. & Golgher, R.R. - Assay of human interferon in Vero cells by several methods. *J.Clin.Microbiol.*, 9:471-475, 1979.
11. Fournier, F.; Falcoff, E. & Chany, C. - Demonstration, mass production and characterization of a heavy molecular weight human interferon. *J.Immunol.*, 99:1036-1041, 1976.
12. Friesen, J.J.; Stein, S.; Sevinger, M.; Familletti, F.C.; Moschera, J.; Meienhoffer, S.; Shively, S. & Pestka, S. Purification and characterization of human fibroblast interferon. *Arch.Biochem. Biophys.*, 206:432-450, 1981.
13. Hartree, E.F. - Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal.Biochem.*, 48:422-427, 1972.
14. Jankowski, W.J.; Von Muenchhausen, W.; Sulkowski, E. & Carter, W.A. - The binding of human interferons to immobilized Cibacron blue F3GA: the nature of molecular interaction. *Biochemistry*, 15:5182-5187, 1976.
15. Knight, E. Jr. & Fahey, D. - Human fibroblast interferon: improved purification. *J.Biol.Chem.*, 256:3609-3611, 1981.
16. Kroon, E.G.; Novo, M.A.S.; Ferreira, P.C.P. & Golgher, R.R. A produção de interferon humano de membranas amnióticas. *Rev. Microbiol.*, 21:121-126, 1990.
17. Mikulski, A.J.; Heine, J.W.; Le, H.V. & Sulkowski, E. - Large-scale purification of human fibroblast interferon. *Prep.Biochem.*, 10:103-119, 1980.
18. Novo, M.A.S. & Golgher, R.R. - Produção de interferon por placenta humana. *Rev.Microbiol.*, 19:190-195, 1988.
19. Parick, I. - Topics in methodology of substitution reactions with agarose. *Meth.Enzymol.*, 34:77-102, 1974.
20. Reis, L.F.L.; Santos, J.R.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G. & Golgher, R.R. - Antigenic characterization of human interferon derived from amniotic membranes induced by virus. *J.Interf.Res.*, 9:573-581, 1989.
21. Stewart II, W.E.; Blalock, J.E.; Burke, D.C.; Chany, C.; Dunnick, J.K.; Falcoff, E.; Friedman, R.M.; Galasso, G.J.; Joklik, W.; Vilcek, J.; Youngner, J.S. & Zoon, K.C. - Interferon nomenclature. *Nature*, 286:110, 1980.
22. Sulkowski, E.; Davey, M.W. & Carter, W. - Interaction of human interferons with immobilized hydrophobic amino acids and dipeptides. *J.Biol.Chem.*, 251:5381-5385, 1976.
23. Weissman, C. & Weber, H. - The interferon genes. *Prog.Nuc. Acid Res. Mol. Biol.* 33:251-299, 1976.
24. Wilkinson, M. & Morris, A. - Interferon with novel characteristics produced by human mononuclear leukocytes. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 111:498-503, 1983.

SEROEPIDEMIOLOGIC SURVEY FOR HEPATITIS A AND B MARKERS IN HEALTH CARE STUDENTS FROM A PUBLIC UNIVERSITY OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL.

Ledy H. S. Oliveira¹
Clara F.T. Yoshida²
Suzy S. Monteiro¹
Fernando P. Câmara³

SUMMARY

In order to verify the prevalence of hepatitis A and B markers in a group from health care courses of a public University from Rio de Janeiro, a seroepidemiological survey has been carried out. Data analysis was made in students of Nursery, Veterinary, Pharmacy, Nutrition and Medicine Courses. The average age of the group was 21 years old. Background information about social and economical conditions were taken through interviews. Sera were obtained from students by applying a randomized method. Competitive enzyme linked immunoassay was used to detect the presence of anti-HAV IgG. Direct immunoenzymatic method was used for detecting HBsAg. All sera were screened for antiHBs by competitive enzyme linked immunosorbent assay (Roche Diagnostic). In 127 sera tested, 54.3% of students were positive for anti-HAV and 1.6% for anti-HBs. There were no carriers for HBsAg. These rates were the lowest encountered in adult Brazilian samples. The highest prevalence of positivity for anti-HAV was found in students of the Nursery Course (75.8%), while the lowest prevalence occurred in students of the Medicine Course (38.0%). Antibodies for HAV was found in 87.50% students with past clinical hepatitis report and in 43.3% students without clinical story of hepatitis. There was no difference among male and female students positive for HAV antibodies. The prevalence of this marker was not influenced by age of students. An index of 79.6% of students who lived in S. Gonçalo were positive for anti-HAV, reflecting the environmental conditions of this city. Analysing the socioeconomic status of students of Nursery and Medicine Courses we noted a remarkable difference among them.

Key Words: Seroepidemiology, Hepatitis A, Hepatitis B.

INTRODUCTION

Hepatitis A virus (HAV) occurs in several parts of the world. When environmental factors

favour widespread intestinal-oral transmission, the disease is endemic and infection is spread among the children. On the other hand, under good sanitation conditions, the spread of the virus

1. Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, 24210 Niterói, RJ, Brasil;
 2. Departamento de Virologia, Fundação Oswaldo Cruz, 21040 Rio de Janeiro, RJ, Brasil;
 3. Departamento de Virologia, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- Correspondence: Dr. L. H. S. Oliveira, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto Biomédico, Universidade Federal Fluminense, Rua Ermani Melo, 24210 Niterói, RJ Brasil.

is restricted to small areas and adulthood is frequently attained without immunity. A seroepidemiological carried out in the United States by Szmuness (18), showed that 45% of 947 individuals were positivity for antibodies against HAV. In the lower classes, the prevalence of antibodies for HAV reached 80%, while in high and middle classes the prevalence was 18% and 30%, respectively. Others investigators (16) concluded the same. Account on that, HAV epidemiology depends on the sanitary and socioeconomic conditions of the populations.

HAV is preferentially disseminated among children and frequency of HAV antibodies increases with age. In urban populations with reasonable levels of personal hygiene the infection in children and teenagers is reduced (18).

The previous exposure to HAV can be determined in sera of people by searching anti-HAV IgG antibodies that persist for years after the infection and determine the immune status to HAV.

The epidemiology of hepatitis B virus (HBV) depends on several factors such as ethnology, age, level of education, living conditions, sexuality and health professional. HBV is mainly transmitted by blood transfusion and sexual contact (contaminated semen). However, the virus is also found in saliva, nasopharyngeal fluids, urine, bile (8) and cerebrospinal fluid (7). It should be assumed that all biological fluids from contaminated individuals may carry the virus.

It is noticeable in HBV epidemiology the presence of asymptomatic individuals that harbor the virus. These carriers are detected by screening the virus surface antigen (HBsAg) in their sera. They are capable of transmitting the virus. The prevalence of infection is high in populations from places without efficient sanitary control of blood or blood products. Health care personnel, who are exposed to blood products and body secretions are also at high risk in acquiring HBV infection (4).

The immune status to HBV can be determined by the presence of anti-HBs, a neutralizing antibody (IgG class) against the virus surface antigen.

In the present study, we not only demonstrate the presence of HAV and HBV markers in a group from health care courses of a public University in Rio de Janeiro state, but also an association between seropositivity and socioeconomic conditions of sample analysed. So, we performed anti-HAV, anti-HBV and HBsAg assays by utilizing immunoenzymatic tests.

MATERIAL AND METHODS

Sera – Sera were collected in 1986 from members of a community of students of Nursery, Veterinary, Pharmacy, Odontology, Medicine and Nutrition Schools from Federal Fluminense University, Rio de Janeiro. At that time, they were in second year (fourth semester) of their courses.

Subjects – Sera were obtained from students by applying a randomized method. The average age of the group was 21 years, with standard deviation of three years. Background information about social and economical status was obtained through interview after they had their blood taken. Most students were single (90%), without financial conditions to maintain themselves, living with their parents, and eating on campus under similar conditions of hygiene. Social economic data were presented in relation to the courses they were taking. These data were taken through the mode of answers (Table 1). Data analysis was made in 29 students of Nursery Course, 22 of Veterinary Course, 19 of Pharmacy Course, 7 of Nutrition Course and 47 of Medicine Course. The total of students of each course is presented in the Table 3.

Statistical analysis – The Chi-square test for sample proportions with a critical p-value of 0.05 was used to examine differences among HAV seropositivity of sample and levels of epidemiologic variables.

Determination of anti-HAV, anti-HBs and HBsAg markers – All sera were stored at -20°C. The tests for anti-HAV and HBs markers were performed in Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Competitive enzyme-linked immunoassay was used to detect the presence of anti-HAV IgG. HAV antigen was obtained from the supernatant of an infected FRhk-4 (fetal rhesus kidney) cell culture. Microplates were coated with anti-HAV antibody obtained from high titered convalescent human serum by precipitation and ion exchange chromatography. Fifty µl of serum samples diluted 1/30 and 50 µl HAV antigen were incubated together in the plate for 2 hs/37°C. In the next step, anti-HAV antibody conjugated to HRP (horseradish peroxidase) was added to the microplate and the substrate orthophenylenediamine (OPD) was added to the system. Absence of colour means a positive result. The tests were read by spectrophotometry at 492 nm and the cut-off was calculated by the ratio: (negative control+ positive control) /2. Values less than the cut-off were considered as a positive result and values greater than the cut-off as a negative result.

For HBsAg determination microplates were coated with IgG anti-HBs and specific affinity chromatographed anti-HBs conjugated with HRP were used in the direct immunoenzymatic method, according to Camargo *et al* (5). All sera were screened anti-HBs by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (Roche Diagnostica) according to the manufacturers instructions.

RESULTS

The socioeconomic status and living place of students are showed in Table 1. Through moda analysis we verified that nursery students came from families with an average of four persons each and with an income from 3 to 10 minimum salaries. Their parents had grammar schooling. Families of pharmacy and nutrition students had a media of five and four persons/family respectively, with familiar income of 10 to 20 minimal salaries and parents who frequented high school. Medicine students came from families with five persons in media with income of 20 to 30 minimum salaries and college schooling. Families of veterinary students had three persons in average and a familiar income up to 30 minimum salaries. Their parents had college schooling.

Among the nursery students, 28% lived in the city of Rio de Janeiro, 36% in Niterói and 36% in S. Gonçalo. Most of veterinary students lived in

the city of Rio de Janeiro (61%) and 13% lived in Niterói. Sixteen per cent of these students lived in country cities of Rio de Janeiro state and 10% were from cities of S. Paulo state. Among the pharmacy students, 53% were from Rio de Janeiro city, 41% from Niterói and 16% from S. Gonçalo. Ninety per cent of nutrition students lived in Rio de Janeiro city and 10% in Niterói. Finally, 67% of medicine students were from Rio de Janeiro city and 33% from Niterói.

Among the 127 serum samples obtained from health students, 69 (54,3%) were antiHAV positive and 2 (1,6%) were anti-HBs positive. One student (0,8%) was anti-HAV and anti-HBs positive. No student was HBsAg positive. The average age of students anti-HAV positive as 22 years old and the average age of students without anti-HAV were 20 years old. The age of students anti-HBs positive was 20 and 21 years old. The anti-HAV and anti-HBs positive student was 20 years old. Age distribution of sample is presented in Figure 1.

Antibodies for HAV were detected in 14 (87.50%) of 16 students with clinical hepatitis report in childhood or early adolescence. No students could inform us what type of hepatitis they had. Antibodies for HAV was found in 55 (43.3%) students without clinical story of hepatitis, indicating a past subclinical infection. Of the two students with antibodies for HBs, one had past clinical illness. The student positive for anti-HAV and anti-HBs did not report of hepatitis (Table 2).

TABLE 1 – Socioeconomic status and living place of Nursery, Veterinary, Pharmacy, Nutrition and Medicine Students.

Socioeconomic status	Nursery	Veterinary	Pharmacy	Nutrition	Medicine
Familiar income (minimum salary)	3-10	> 30	10-20	10-20	20-30
Parents Education	grammar	graduate	secondary	secondary	graduate
Nº of people/family average	4	3	5	4	5
Living place they were from (%)					
Rio de Janeiro (city)	28%	61%	53%	90%	67%
Niterói	36%	13%	41%	10%	33%
São Gonçalo	36%		16%		
Southern states		10%			
Rio de Janeiro (state-country cities)		16%			

FIGURE 1 – Age distribution in sample studied

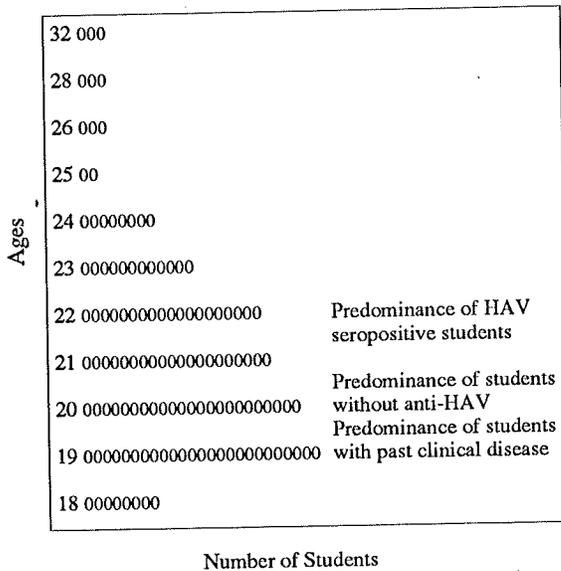


TABLE 3 – Prevalence of HAV antibodies in students of health care courses from Fluminense Federal University.

Courses	Total of students	Students tested	Positive students for anti-HAV (%)
Nursery	44	29	22 (75.8%)
Veterinary	50	22	13 (59.0%)
Pharmacy	47	19	11 (57.8%)
Nutrition	18	7	4 (57.1%)
Medicine	78	47	18 (38.0%)
Odontology	7	3	1

TABLE 4 – Distribution of positive students for anti-HAV by living place.

Locality	Students tested	Positive students for anti-HAV (%)
Rio de Janeiro	65	30 (46.1%)
Niterói	37	20 (54.0%)
São Gonçalo	13	10 (76.9%)

TABLE 2 – Distribution of positivity for anti-HAV and anti-HBs in students with asymptomatic and symptomatic cases.

	anti-HAV	anti-HBV	nor anti-HAV neither anti-HBs	anti-HAV and anti-HBs
asymptomatic cases	55 (43.3%)	1 (0.8%)	– –	1 (0.8%)
symptomatic cases	14 (11.0%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)	– –
Total	69 (54.3%)	2 (1.6%)	1 (0.8%)	1 (0.8%)

* Of the remaining students (12) who lived in several others cities, 9 were HAV seropositive.

Among the students positive for anti-HAV, the highest prevalence occurred in the Nursery Course (75.8%), following the Veterinary Course (59.0%) Pharmacy Course (57.8%), and Nutrition Course (57.1%). The lowest prevalence was found in the Medicine Course (38.0%). The number of odontology students was very small for a statistical analysis (Table 3). Nursery students had a significantly higher HAV antibody prevalence than medicine students (significance for $p > 0.01$, $v = 1$, $x^2 = 4.10$). We have found significantly difference between medicine students and nursery students, but not among medicine of nursery students and student of other courses (Table 3).

Among the students from Rio de Janeiro, 30 (46,1%) had antibodies against HAV; among the 37 students from Niterói, 20 (54%) were seropositive and among the 13 students from S. Gonçalo,

10 (76,9%) were seropositive for HAV (Table 4). Students from São Gonçalo who showed positivity for anti-HAV presented significantly difference from students from Rio de Janeiro (significance for $p = 0.05$, $v = 1$, $x^2 = 4.10$). This difference was not detected among students from São Gonçalo and from Niterói ($v = 1$, $x^2 = 2.10$) and also among students from Rio and from Niterói. The interviews revealed that the most of individuals lived in the same places since childhood.

Of 53 male students, 27 (50.9%) were positive for anti-HAV. Of 74 female students, 42 (56.7%) were positive too. There was no difference among male and female students positive for HAV antibodies ($x^2 = 0.81$).

The prevalence of antibodies for HAV in students of different courses was not influenced by their age.

DISCUSSION

Our study aims the endemic aspect of hepatitis A in Rio de Janeiro according to previously reported studies (1, 13, 17, 19). But our data also revealed the selected characteristics of the sample analysed. The epidemiology of hepatitis A

is strongly affected by level of sanitation or hygiene in the environment. Lopes (13) and Yoshida (19) reported that 98% and 97% respectively of volunteer blood donors were positive for anti-HAV, indicating a story of infection. The frequency of antibodies for hepatitis A increases with age. In the United States about 10% of children and 45% of adults show positivity for HAV (6). Of 64 individuals analysed during epidemic outbreaks in the Amazonas (11), 64.7% were positive for HAV, with an average age of eight years old and discrete predominance of female sex. In the same area (Juruá river), the prevalence for HAV antibodies were 95% among young adults (10). In populations under conditions of poverty (inadequate housing, financial dependence, unpiped water supply, inadequate sanitary procedures), studies reveal that approximately 100% of children acquire immunity during the first decade of life (2, 12, 3).

We detected 54.3% of individuals with antibodies for HAV in a university community. This figure shows the lowest prevalence of seropositivity for hepatitis A found in Brazilian samples, although an accurate investigation has not been done in this country. Suttmoller *et al.* (17), analysing an outbreak of hepatitis A in a Research Center of Petrobrás, Rio de Janeiro, found an average of 77% of individuals with past infection by HAV. He concluded this prevalence reflected a high social-economic standard of this group in comparison with other groups studied. In the same paper he shows a significant difference in prevalence for anti-HAV among university graduates (65%) compared with employees with secondary level of education (89%). Our data also support the idea that the level of education is directly related to the level of hygienic or sanitation conditions, and closely related to the way of living.

HAV is endemic in Brazil. It is responsible for the most of hepatitis cases notified to Epidemiologic Vigilance (9). This endemic character of HAV was also observed in our sample. Of the 16 students with past clinical disease 14 (87.5%) had antibodies for HAV and 1 (6.25%) had antibodies for HBs.

Hepatitis A is a mild illness and inapparent infection, commonly found in children and young people (14). Our study demonstrates the high frequency of asymptomatic cases (43.3%) in comparison with the symptomatic cases (11.0%) confirming this aspect in HAV infection.

An examination of anti-HAV frequency in students belonging to several health courses, revealed that the highest prevalence occurred in the nursery

students (75.8%), although this prevalence is lower than were found in another adult Brazilian surveys of hepatitis A (13, 19, 10). The lowest incidence of HAV antibody was found in the medicine students (38.0%). Analysing the socioeconomic status of students of these two courses we also noted a remarkable difference among them. Most of the nursery students were from family with low income and education level (Table 1). On the other hand, most of the medicine students belonged to middle class families with university level education. Medicine Course is the most requested among courses of health area. Nursery Course is one of the less. These differences in choosing courses should be explained by the status attributed to each profession. The prestige of the careers is right related to number of candidates to entrance exams. To get a place in a very requested course, candidates must be well prepared. Most candidates who pass in these exams studied in expensive schools. So, entrance exams make a social selection. Besides, Ribeiro (15), showed that the choice of profession in a teenager is strongly affected by his social environment. People from lower classes had his choice restricted to little prestigious careers.

Surprisingly, 7 of 14 students who reported past clinical illness belonged to Medicine course. The remaining were distributed among other courses.

Niterói and São Gonçalo are two cities near to Rio de Janeiro. Of our sample, among the S. Gonçalo residents, 76.9% were HAV antibody positive, a result not significantly different from that of Niterói residents (54.0%) but significantly different from that of Rio de Janeiro residents (46.1%). In a hazardous survey done by Abzwaïd (1) in Niterói among 259 individuals, a prevalence of 74.5% seropositive individuals for anti-HAV was found. There is no report of hazardous survey made in Rio de Janeiro city nor in São Gonçalo. This industrial city with about 3 million inhabitants, has a precarious system of drained galleries. The study does not allow us any association between seropositivity of students and seropositivity of population they were from. We do not verify a significant difference among seropositive nursery students from Rio de Janeiro, Niterói or São Gonçalo, although 36% of nursery students lived in São Gonçalo.

The veterinary students, although having a high socioeconomic status, presented higher index of seropositivity for anti-HAV than nutrition, pharmacy and medicine students. This difference was not significant. However, some of veterinary students came from country lands which sanitation conditions are not satisfactory.

The findings about seropositivity for HBV markers also showed the selective aspect of sample face to other groups. Yoshida *et al.* (19) verified anti-HBs prevalence of 7.7% and HBsAg prevalence of 1.5% in prime blood donors from Rio de Janeiro. Our sample had no HBs carriers. Considering that we analysed future health care professionals, this result seems to be excellent.

In conclusion, our data confirms that, despite the endemic occurrence of HAV and HBV, its epidemiological pattern is affected by socioeconomical status, level of education and environment sanitation. In the college environment, whose people are selected by schooling, we detected a lower rate of individuals exposed to HAV. Besides, we also detected a close relation between seropositivity for HAV and status of careers in a public university.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are in debt to A. C. Quintaes, A. O. Santos and J. Lamarca by their technical assistance. We also are grateful to Dr. M. E. F. Fonseca for critical review of the manuscript. Research supported by PROPP-UFF.

RESUMO

Com o objetivo de verificar a prevalência de marcadores da hepatite A e B, foram testados 127 soros de estudantes sadios da área de Saúde de uma universidade pública do Rio de Janeiro. Verificou-se que 54,3% da amostra era positiva para anti-HAV e 1,6% para anti-HBs. Não havia portadores para HBs. A mais alta prevalência de estudantes positivos para anti-HAV foi encontrada no Curso de Enfermagem (75,8%), e a mais baixa prevalência em alunos do Curso de Medicina (30,0). 79,6% dos estudantes com residência em S. Gonçalo eram positivos para anti-HAV, refletindo as condições ambientais desta cidade. Foi constatada uma associação entre soropositividade para anti-HAV e condição social dos estudantes.

REFERENCES

1. Abzwaida, A.R.N.; Sidoni, M.; Yoshida, C.F.T. & Schatzmayer, H. G. - Seroepidemiology of hepatitis A

- and B in two communities of Rio de Janeiro. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 29: 219-223, 1987.
2. Ajdukiewicz, A. & Mosley, J.W. - Hepatitis A virus exposure in the Gambia. *Lancet*, 2: 1966, 1979.
3. Barin, F.; Denis, F.; Chotard, J.; Paulin, R.; Chiron, J.P.; Maupas, Ph.; Goudeau, A. & Cousarget, P. - Early asymptomatic hepatitis A in Senegalese children. *Lancet*, 1: 212-213, 1980.
4. Byrne, E.B. - Viral hepatitis: an occupational hazard of medical personnel. *JAMA*, 195: 362-364, 1966.
5. Camargo, I.P.; Gaspar, A.M.C. & Yoshida, C.F.T. - Comparative ELISA reagents for detection of hepatitis B surface antigen (HBsAg). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1988.
6. Cases specified notifiable diseases - United States. *MMWR*, 32: 682, 1984.
7. Dankert, J.; Postma, A.; deVries, J.A. & Zigstra, J.B. - HbsAg in spinal fluid from leukemic children. *Lancet*, 1: 690, 1975.
8. DeFlora, S. & Force, F. - Hepatitis B surface antigen in pleural fluid. *Lancet*, 1: 1269, 1977.
9. Escrivo Junior, A.; Moraes, J.C. & Camargo, M.C.C. - Hepatite: Normas e instruções. Manual de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Saúde do Estado de S. Paulo, 52pp, 1985.
10. Gayotto, L.C.C.; Quarantei, A.A. & Cabral, G.L. - Seroepidemiologia das hepatites A e B nas regiões dos rio Bia e alto Juruá, Amazonas Ocidental. *GED*, 3: 106-112, 1984.
11. Gayotto, L.C.C.; Quaresma, A. & Cabral, G.L. - Serological markers in epidemics of hepatitis in the area of Carauri, on the River Juruá (State of Amazonas, Brasil). *Editorial da Sociedade Latinoamericana de Hepatologia*. VII: 1-3, 1986.
12. Frosner, G.G.; Papaevanelou, G.; Butler, R.; Iwarson, S.; Lindhol, A.; Courouce-Pauty, A. & Deinhardt, F. - Antibody against hepatitis A in seven European countries. I - Comparison of prevalence data in different age groups. *Am. J. Epidem.*, 110: 63-68, 1979.
13. Lopes, M.B.L. - Personnel communication, 1979.
14. Marier, R. - The reporting of communicable disease. *Am. J. Epidem.*, 105: 587-590, 1977.
15. Ribciro, S.C. - Vestibular 1988: Seleção ou exclusão? *Ciência Hoje*, 49: 70-73, 1988.
16. Schenzle, D.; Dietz, K. & Frosner, G.G. - Antibody against hepatitis A in seven European countries. II - Statistical analysis of crosssectional survey. *Am. J. Epidemiol.*, 110: 70-76, 1979.
17. Suttmoller, F.; Gaspar, A.M.C.; Cynamon, S.E.; Richa, N.; Mercadante L.A.C. & Schatzmayer, H.G. - A water borne hepatitis A outbreak in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 77: 9-17, 1982.
18. Szmuness, W. - Recent advances in the study of the epidemiology of hepatitis B. *Am. J. Pathol.*, 81: 629-649, 1975.
19. Yoshida, C.F.T.; Nogueira, R.M.R.; Mercadante, L.A.C.; Pinhão, A.T. & Schatzmayer, H.G. - Seroepidemiological survey of hepatitis A and B, cytomegalovirus and herpes simplex type 2 in prime blood donors from Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Microbiol.*, 18: 5-11, 1987.

Received for publication in 27/8/90.

SENSITIVITY TO MERCURIC CHLORIDE OF *BACTEROIDES FRAGILIS* GROUP ISOLATES IN DIFFERENT GROWTH MEDIA: MEDIUM-DEPENDENT VARIATION

Mario Julio Avila-Campos¹
Maria Auxiliadora Roque de Carvalho¹
Carlos Américo Veiga Damasceno¹
Edmar Chartone-Souza²
Eduardo Osório Cisalpino¹

SUMMARY

"In vitro" activity of mercuric chloride against 52 strains of the *Bacteroides fragilis* group isolated from marmosets *Callithrix penicillata* was studied in different media using agar dilution and broth dilution methods, at pH 7.2. The MIC₅₀ and MIC₉₀ determined in broth medium were markedly lower than those seen when the agar dilution method was used. On the other hand, mercuric chloride showed a poor activity on brain heart infusion blood agar medium. Nearly all of the 52 isolated strains tested and also the reference strains showed resistance at the breakpoint (2 ug/ml) for the heavy metal in both BHI agar media, supplemented with either hemin or blood.

Key Words: Anaerobic bacteria; *Bacteroides fragilis* group; Mercuric chloride – MIC.

INTRODUCTION

Interactions of bacteria with heavy-metal ions arisen considerable interest in recent years(23). Studies were focused especially on conversions of mercuric ions into volatile inorganic mercury (Hg⁰) from sediments that contain this element in different toxic forms, e.g. methyl-mercury(21).

Mercury resistance may be related to the use of mercurial compounds in industry, agriculture, and hospitals (2,24).

Several aerobic and/or facultatively anaerobic bacteria harbor plasmid that mediate the cleavage of mercury-carbon bonds in organomercurials and/or reduce mercuric (Hg²⁺) ions to the volatile form (Hg⁰)(16). The role of anaerobic microor-

ganisms in mercuric biotransformations is not well understood(17).

On the other hand, reports on the multiple resistance of bacteria to antimicrobial agents and their possible association with the resistance to mercuric ion have been published (8,17), but there is no data on marmoset isolates.

It is mentioned that mercury resistance determinants are common among both naturally occurring and clinically isolated bacterial populations (16), but although they are common it is not clear at present to what extent could some methodological factors influence the expression of these genetic characteristics.

The aim of this study was to compare results on mercury susceptibility of isolates of the *Bacte-*

-
1. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP. 2486, CEP 30.161, Belo Horizonte, MG, Brazil.
 2. Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP. 2486, CEP 30.161, Belo Horizonte, MG, Brazil.

roides fragilis group recovered from *Callithrix penicillata* marmosets, in different media using agar dilution and broth dilution methods, at pH 7.2.

MATERIAL AND METHODS

A total of 52 *Callithrix penicillata* marmoset isolates of the *Bacteroides fragilis* group was tested: 26 *B. fragilis*, 11 *B. vulgatus*, 7 *B. ovatus*, 6 *B. distasonis*, and 2 *B. thetaiotaomicron*. The *C. penicillata* marmosets were maintained in captivity in the animal house of the ICB/UFGM.

The bacteria were isolated in selective *Bacteroides fragilis* -bile-esculin medium (BBE), pH 7.2 (12), incubated in anaerobic conditions (90% N₂/10% CO₂) at 37°C for 48h. The isolates were biochemically identified to the species level (9,20).

The Minimal Inhibitory Concentrations (MICs) were determined in different media either by agar dilution method in glass Petri dishes, as described by Sutter *et al.* (19), with a growth medium modification, or by a macrodilution method (6). The following media were used: brain heart infusion agar containing 0.5% yeast extract (BHIA); BHIA supplemented with 0.5 ug/ml hemin; BHIA supplemented with 0.5 ug/ml menadione; BHIA supplemented with 0.5 ug/ml menadione plus 0.5 ug/ml hemin; BHIA enriched with 5% blood; BHI broth supplemented with 0.5 ug/ml hemin, all of them at pH 7.2. Media were prepared 2-4h before the test. Mercuric chloride (HgCl₂) was added at final concentrations of 0 to 128 ug/ml.

The inoculum was prepared in brain heart infusion broth supplemented with 0.5 ug/ml hemin, incubated at 37°C in an anaerobic atmosphere (90% N₂/10% CO₂) using a final inoculum of approximately 10⁵ cfu per tube and per spot. The broth media were inoculated with aliquots of 100 ul of each test strain, and the plates with fresh medium by a Steers replicator (18). The inoculum size was verified by colonies count. They were incubated then for 24 and 48h, respectively, in anaerobic conditions as described. After the incubation period, the MIC for each tested strain was recorded as the lowest concentration of the agent that prevented macroscopic growth. Reference strains of *B. fragilis* ATCC 23745 and *B. vulgatus* ATCC 8482, were included in the tests.

RESULTS

The susceptibilities of the 52 marmoset *B. fragilis* group isolates to mercuric chloride are shown in Table 1 as the ranges of MICs observed,

TABLE 1 - "In vitro" activity of mercuric chloride against 52 marmoset isolates of the *B. fragilis* group, in various media, at pH 7.2.

Tested Media	MIC (µg/ml)			% Resistant ^a
	Range	50%	90%	
BHI AGAR	1 - 8	4	4	63
BHI - M ¹ AGAR	≤0.25 - 8	4	4	63
BHI - MH ² AGAR	≤0.25 - 8	4	8	81
BHI - H ³ AGAR	2 - 16	4	8	98
BHI - H ⁴ BROTH	1 - 4	2	2	4
BHI - B ⁵ AGAR	8 - 128	32	128	100

a. Percentages of resistant isolates at breakpoints for HgCl₂ (2 µg/ml).

1. BHI agar plus menadione (0.5 µg/ml).
2. BHI agar plus menadione (0.5 µg/ml) and hemin (0.5 µg/ml).
3. BHI agar plus hemin (0.5 µg/ml).
4. BHI broth plus hemin (0.5 µg/ml).
5. BHI agar plus blood (5%).

the MICs for 50% and 90% of tested isolates (MIC₅₀ and MIC₉₀, respectively), and the percentages of the resistant bacteria in the different media tested, at pH 7.2.

The Figures 1 and 2 show, respectively, the percentages of susceptibility, for each concentration of the mercuric chloride, and the cumulative percentages of sensibility of the tested isolates to mercuric chloride at different concentrations, in different media, pH 7.2.

Reference strains *B. fragilis* ATCC 23745 and *B. vulgatus* ATCC 8482 showed, respectively, the following MICs values: BHI agar, 4 ug/ml and 4 ug/ml; BHI-M agar, 4 ug/ml and 2 ug/ml; BHI-MH agar, 8 ug/ml and 4 ug/ml; BHI-H agar, 8 ug/ml and 4 ug/ml; BHI-H broth, 2 ug/ml and 1 ug/ml; BHI-B agar, 32 ug/ml and 16 ug/ml.

DISCUSSION

Table 1 and Figures 1 and 2, show that only few isolates were resistant to mercuric chloride in BHI broth supplemented with hemin in comparison to the solid media used. The MICs required for 50% and 90% growth inhibition of the isolates (MIC₅₀ and MIC₉₀, respectively) in the broth medium were markedly lower than those seen when the agar dilution method was used. In fact, these results could be due to a better diffusion of the agent in broth medium.

Nearly all to the 52 isolated strains tested and also reference strains showed resistance at the breakpoint (2 ug/ml) for mercuric chloride in both BHIA supplemented with either hemin or blood

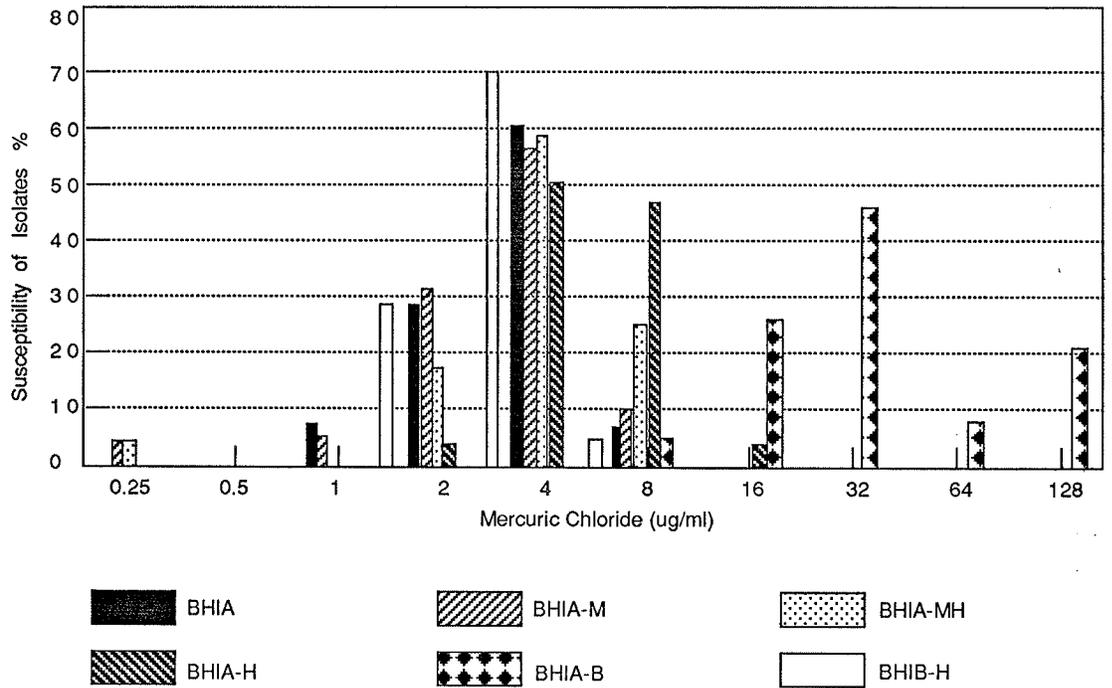


FIGURE 1 - Minimal inhibitory concentration of mercuric chloride in different growth media, at pH 7.2, against 52 non-human isolates of the *B. fragilis* group

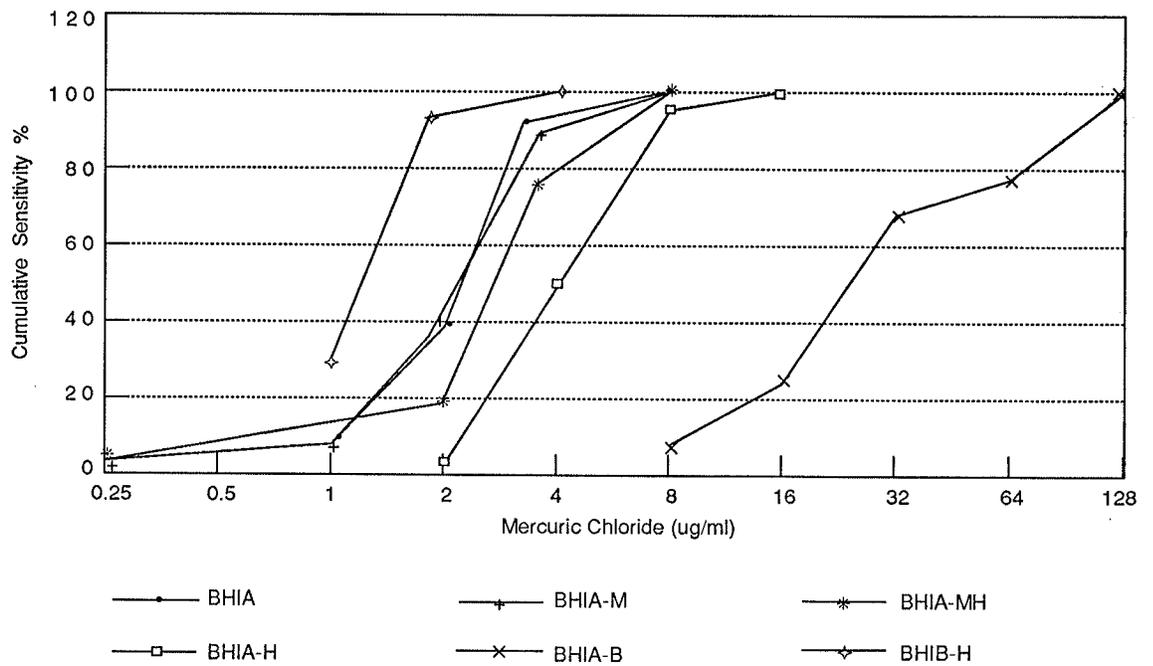


FIGURE 2 - Percentages of cumulative sensitivity to mercuric chloride of 52 non-human isolates of the *B. fragilis* group in different growth media, at pH 7.2

(98% and 100%, respectively).

On the other hand, the MICs determined in BHI-blood agar alone showed the major discrepancies when compared with the other growth media. Thus, MIC₅₀ and MIC₉₀ in that particular medium showed the highest values for all tested isolates (values ≥ 16 fold to ≥ 64 fold higher, compared with values determined in the broth medium).

The MICs required for growth inhibition of the reference strains (*B. fragilis* ATCC 23745 and *B. vulgatus* ATCC 8482) in the broth medium were also lower (2 μ g/ml and 1 μ g/ml, respectively) than those required when the BHI-blood agar was used (32 μ g/ml and 16 μ g/ml, respectively).

Figures 1 and 2 more evidently document the differences in the susceptibility of the isolates to mercuric ion in relation to the composition of the growth media. Included are also cumulative percentages.

The differences in the MICs of the mercuric ion observed in this study, appear to be dependent on composition of the growth media and on the methods used. Data on these variables were also established by Aldridge & Sanders (1), when comparing antimicrobial susceptibility tests for anaerobes.

The discrepancies in mercuric ion susceptibility observed in different growth media could be to cellular and other physiologic alterations induced by media components or added supplements, to bacterial enzymatic alterations of the agent, or to interference of media components with the action of such agent, or even to the agent loss by other phenomena such as volatilization.

For many fastidious anaerobes multiple growth factors are required such as peptides, hemin, vitamin K or sodium succinate which can partially replace the vitamin K requirement if the hemin is present (10). Lev & Milford (11) observed that vitamin K was necessary for good growth of black-pigmented *Bacteroides* species, and it could play an important role in the stabilisation of cell envelopes through its effect on phospholipids content.

In obligately anaerobic bacteria, the hemin is believed to serve as a prosthetic group. However, it seems that hemin can be utilized in electron transport by these microorganisms, but its functional role is still obscure, and needs further studies (7). McKee *et al.* (13) reported that *Bacteroides (Porphyromonas) gingivalis*, could not grow in absence of hemin, though it grows in absence of vit. K. It is possible that the influence of mercury on anaerobes could be inhibited through competition with hemin or blood Fe⁺ for protein binding target sites. Recently, it was demonstrated that black-pigmented

Bacteroides spp. cannot utilize free iron from the host, however, they are capable to degradate the iron-transporting plasma proteins (4).

It is believed that the presence of the mercuric ion in growth medium increases the generation time of most microorganisms, possibly due to a prolonged lag phase (5).

Plasmid bacterial mercury resistance can generally be divided into two categories, i.e. broad spectrum (mercuric reductase and organomercurial lyase enzymes) and narrow spectrum resistance (mercuric reductase enzyme) (17). Pan-Hout *et al.* (14) observed the ability of *Clostridium cochlearium* T-2 to cleave organomercurial compounds mediated by plasmid and, if the anaerobic failed to yield plasmid, mercury could be methylated. On the other hand, studies carried out on *B. fragilis* show that resistance in this organism is chromosomally mediated (15, 22).

Significant interactions between metal species, chelating agents and test media have been reported (3). Our results show that addition of blood to solid media strongly decreases the mercury activity.

Thus, it seems that methodological factors have a marked influence on the results. Indeed, our results confirm literature data suggesting that media components and added supplements for specific bacterial groups do, in fact, interfere with the action of antibacterial agents, as well as do other variables, e.g. inoculum size, incubation condition, pH, and temperature (1,2).

Finally, it is important to characterize the properties of a most suitable medium for MICs determination. Unfortunately, data from the literature show that many of these had not an adequate quality control.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Luzia Rosa Resende for the technical help.

This work was supported by grants of the CNPq, CPq/UFMG, and FINEP.

RESUMO

Sensibilidade ao bicloreto de mercúrio de isolados do grupo *Bacteroides fragilis* em diferentes meios de cultura: variação meio-dependente

Estudou-se a atividade "in vitro" do bicloreto

de mercúrio contra 52 cepas de bactérias do grupo *Bacteroides fragilis* isoladas de saguis *Callithrix penicillata*, em diferentes meios de cultura, usando-se os métodos de diluição em ágar e diluição em caldo, a pH 7,2. As CIM₅₀ e CIM₉₀ determinadas em meio líquido foram acentuadamente menores que aquelas observadas quando se utilizou o método de diluição em ágar. Por outro lado, observou-se pobre atividade do bicloreto de mercúrio no meio sólido enriquecido com sangue. A maioria das 52 cepas isoladas testadas, assim como as cepas de referência, foram resistentes ao ponto crítico (2 ug/ml) para o metal pesado nos meios sólidos, suplementados com hemina ou com sangue.

Palavras-chave: Bactérias anaeróbias; grupo *Bacteroides fragilis*, Bicloreto de mercúrio - CIM.

REFERENCES

1. Aldridge, K.E. & Sanders, C.V. - Antibiotic - and metho-dependent variation in susceptibility testing results of *Bacteroides fragilis* group isolates. *J.Clin. Microbiol.*, 25: 2317-2321, 1987.
2. Avila-Campos, M.J.; Farias, L.M.; Carvalho, M.A.R.; Damasceno, C.A.V. Chartone-Souza, E. & Cisalpino, E.- *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans*: resistance to mercuric chloride of 41 strains isolated in Brazil. *Res. Microbiol.*, 140:51-55, 1989.
3. Bird, N.P.; Chambers, J.G.; Leech, R.W. & Cummins, D. - A note on the use of metal species in microbiological test involving growth media. *J. Appl. Bacteriol.*, 59:353-355, 1985.
4. Carlsson, J.; Hofling, J.F. & Sundqvist, G.K. - Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black-pigmented *Bacteroides* species. *J. Med. Microbiol.*, 18:39-46, 1984.
5. Clark, D.J.; Weiss, A.A. & Silver, S - Mercury and organomercurial resistances determined by plasmids in *Pseudomonas*. *J. Bacteriol.*, 132:186-196, 1977.
6. Ericsson, H.M. & Sherris, J.C. - Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 217: 1-90, 1971.
7. Gibbons, R. J. & MacDonald, J.B. - Hemin and vitamin K compounds as required factors for the cultivation of certain of *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.*, 80:161-170, 1960
8. Groves, D.J.; Short, H.; Thewaini, A.J. & Yong, F.E. - Epidemiology of antibiotic and heavy metal resistance in bacteria: resistance patterns in staphylococci isolated from populations in Iraq exposed and not exposed to heavy metals or antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7:622-628, 1975.
9. Holdeman, L.V.; Cato, E.P. & Moore, W.E.C. - Anaerobe Laboratory Manual, 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, 1977.
10. Lev, M.; Keudell, K.C. & Milford, A.F. - Succinate as a growth factor for *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Bacteriol.*, 108:175-178, 1971.
11. Lev, M. & Milford, A.F. - Effect of vitamin K depletion and restoration on sphingolipid metabolism in *Bacteroides melaninogenicus*. *J. Lipid. Res.*, 13: 364-370, 1972.
12. Livingston, S.J.; Kominos, S.D. & Yee, R.B. - New medium for selective and presumptive identification of the *Bacteroides fragilis* group. *J. Clin. Microbiol.*, 7: 448-453, 1978.
13. McKee, A.S.; McDermid, A.S., Baskerville, A.; Dowsett, B.; Ellwod, D.C. & Marsh, P.D. - Effect of hemin on the physiology and virulence of *Bacteroides gingivalis* W-50. *Infect. Immun.*, 52:349-355, 1986.
14. Pan-Hou, H.S.K.; Hosono, M. & Imura, N - Plasmid controlled mercury biotransformations by *Clostridium cochlearium* T- 2. *Appl. Environm. Microbiol.*, 40:1007-1011, 1980.
15. Riley, T.V. & Mee, B.J. - Susceptibility of *Bacteroides spp.* to heavy metals. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 22:889-892, 1982.
16. Robinson, J.B. & Tuovinen, O.H. - Mechanisms of microbial resistance and detoxification of mercury and organomercurial compounds: physiological, biochemical, and genetic analysis. *Microbiol. Rev.*, 48:95-124, 184.
17. Rudrik, J.T.; Bawdon, R.E. & Guss, S.P. - Determination of mercury and organomercurial resistance in obligate anaerobic bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 31:276-281, 1985.
18. Steers, E.; Foltz, E.L. & Graves, B.S. - An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antimicrob. Chemother.*, 9:307-311, 1959.
19. Sutter, V.L.; Barry, A.L.; Wilkins, T.D. & Zabransky, R.J. - Collaborative evaluation of a proposed reference dilution method of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 16:495-502, 1979.
20. Sutter, V.L.; Citron, D.M. & Finegold, S.M. - *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, 3rd ed. The C.V. Mosby Co., St. Louis, Mo., 1980.
21. Timoney, J.F.; Port, J.; Giles, J. & Spanier, J. - Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of sediments of New York bight. *Appl. Environm. Microbiology*, 136:465-472, 1978.
22. Wallace, B.L.; Bradley, J.E. & Rogolsky, M. - Plasmid analysis in clinical isolates of *Bacteroides fragilis* and other *Bacteroides* species. *J. Clin. Microbiol.*, 14:383-388, 1981.
23. Williams, J.M. & Silver, S. - Bacterial resistance and detoxification of heavy metals. *Enzyme Microb. Technol.*, 6:530-537, 1984.
24. Zscheck, K.K. & Murray, B.E. - Evidence for a staphylococcal-like resistance gene in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 34:1287-1289, 1990.

Received for publication in 07/01/91

ESQUEMA SIMPLIFICADO DE IDENTIFICACIÓN DE LAS ESPECIES DE *STAPHYLOCOCCUS* COAGULASA-NEGATIVA AISLADOS DE INFECCIONES HUMANAS

Emma G. Sutich¹
Adriana Belmonte²
Mónica Noguerras²
Marta María Llop¹

RESUMEN

En este trabajo se identificaron 100 cepas de estafilococos coagulasa negativa aisladas de diferentes muestras clínicas. Buscando la correlación entre homología de DNA y características fenotípicas se los dividió en dos grandes grupos por la sensibilidad a la novobiocina y agregando la detección de beta-galactosidasa y oxidasa se determinó 4 grupos (cuadro 1): grupo de especies de *S. epidermidis*, grupo de especies de *S. simulans*: grupo de especies de *S. saprophyticus* y grupo de especie de *S. sciuri* que son factibles de resolver en todo laboratorio de microbiología clínica. Por agregado de otras pruebas simples: detección de ureasa, fosfatasa alcalina y beta-glucosidasa y detección aeróbica de acidez de maltosa, trehalosa y manitol se determina las especies del grupo *S. epidermidis* (cuadro 2). Generalmente dada la mayor frecuencia del *S. epidermidis* es suficiente solamente la detección de ureasa y fosfatasa alcalina. Las especies del grupo *S. simulans* se identifican con la determinación de ureasa: fosfatasa alcalina y acidez de manitol (cuadro 3): con la realización de ureasa y acidificación de sacarosa y arabinosa se establece las especies del grupo *S. saprophyticus* y únicamente por medio de la rafinosa las especies del grupo *S. sciuri* (cuadro 5).

La correlación de estas mínimas pruebas obtenidas en nuestras determinaciones con las numerosísimas realizadas según presenta el Manual de Bergey 9ª edición, nos permite considerar la aplicabilidad de este esquema simple y rápido para diferenciar las especies coagulasa negativa del género *Staphylococcus* en la mayoría de los laboratorios de bacteriología clínica.

Palabras claves: *Staphylococcus*, coagulasa negativa; novobiocina; especies de *Staphylococcus*.

INTRODUCCION

En 1974 (1, 9, 10, 11, 14, 15) Kloos y Schleifer proponen una clasificación de las especies hasta entonces reconocidas de estafilococos coagulasa negativa en función de 12 pruebas fisiológicas,

permitiendo así su diferenciación.

Pero el corriente Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey (16) presenta 18 especies pertenecientes a este género dentro de los coagulasa negativa.

Por la hibridización de DNA-DNA y carac-

1. Cátedra de Microbiología Aplicada - Area Bacteriología Clínica - Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario - Rosario - Argentina.
2. Cátedra de Microbiología, Parasitología y Virología - Facultad de Ciencias Médicas - Universidad Nacional de Rosario - Rosario - Argentina.
Dirección postal: Dra. Emma Sutich - Departamento de Microbiología - Fac. de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - Universidad Nacional de Rosario - Suipache 531 - (2000) Rosario - Argentina.

terísticas fenotípicas se agrupa las especies en 4 grupos: Grupo de especies *S. epidermidis* que comprende: *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* y *S. saccharolyticus*. Grupo de especies de *S. simulans* que está compuesto de las especies *S. simulans* y *S. carnosus*. Grupo de especies de *S. saprophyticus* que está compuesto de las especies: *S. saprophyticus*, *S. cohnii 1*, *S. cohnii 2* y *S. xylosus*; y grupo de especies de *S. sciuri* que está compuesto de las especies *S. sciuri* y *S. lentus*.

El objetivo de este trabajo, fue del total de pruebas bioquímicas señaladas en el Manual de Bergey 9ª edición encontrar un esquema mínimo que permita una simple y correcta identificación.

MATERIAL Y METODOS

En este trabajo se estudiaron 100 cepas, todas provenientes de distintos materiales de origen clínico humano. Se emplearon cepas de referencia: *S. epidermidis* ATCC 14990; *S. capitis* ATCC 27840; *S. warneri* ATCC 27836; *S. haemolyticus* ATCC 29970; *S. hominis* ATCC 27844; *S. saccharolyticus* ATCC 33753; *S. saprophyticus* ATCC 15305; *S. cohnii* ATCC 29974; *S. xylosus* ATCC 29971; *S. simulans* ATCC 27848; *S. carnosus* DSM 20501; *S. sciuri* ATCC 29062; *S. lentus* ATCC 29070, para control de los medios usados y la adaptación de técnicas.

Las pruebas empleadas son las siguientes: detección de coagulasa (13); sensibilidad a Novobiocina con discos de 5 µg (1); detección de beta galactosidasa (13); oxidasa (13); ureasa (13); fosfatasa alcalina (13); producción de ácido a partir de los siguientes carbohidratos: maltosa, D-trehalosa; D-manitol; sacarosa; L-arabinosa; rafinosa (13).

Para completar el estudio de las características fenotípicas aconsejadas por Schleifer (16) y Kloos (12) se efectuaron crecimiento en agar con 10 y 15% CINA; crecimiento a 15 y 45°C, producción de acetoina, producción aeróbica de ácido a partir de D-xilosa, L-arabinosa, D-celobiosa, D-manosa, D-trehalosa, lactosa, D-galactosa, D-fructosa, D-melizitosa, D-ribosa y xilitol; reducción de nitratos; arginina dehidrolasa, beta-glucosidasa, beta-glucuronidasa.

Es de señalar que en la detección de beta-galactosidasa se modifica la técnica original. Se emplea discos impregnados de ortonitrofenil beta-D-galactopiranosido. Se suspende 2 o 3 colonias del germen aislado en agar que no contenga lactosa. Se va a detectar la enzima constitutiva, que es

una característica diferencial de especie, no así la enzima inducida. Incubar a 35°C hasta 24 hs.

Control positivo: *S. simulans*. Control negativo: *S. aureus*.

RESULTADOS

Se tomó como criterio de identificación que no difiera en más de una prueba y en algunos dos pruebas del total de las estudiadas.

En la Tabla I se presentan los % de positividad de las pruebas realizadas a cada una de las especies determinadas cuyo número total de cepas aisladas se mencionan en la primera línea.

Las características distintivas de cada especie son aquellas con un porcentaje de positividad de 100 o cercano al mismo o un 0% de positividad.

DISCUSION

En nuestro trabajo se aisló un número considerable de cepas de *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. haemolyticus*, *S. warneri* y *S. cohnii*; pero una sola cepa o un número pequeño de las otras especies que no son tan frecuentes en infecciones clínicas.

Observando la tabla I vemos que la identificación de las especies del Grupo *S. epidermidis* son las más difíciles, pero la determinación de fosfatasa alcalina colabora inicialmente a detectar el *S. epidermidis* que es el más numeroso de los aislamientos en este grupo, constituyendo una prueba diferencial con 100% de positividad para *S. epidermidis* y 0% para los otros: que se los identifica con producción de acidez a partir de maltosa, trehalosa, manitol y detección de Beta-glucosidasa que en nuestra experiencia presentaron valores significativamente distintos.

La identificación de las especies del Grupo *S. simulans* con la simple determinación de ureasa: fosfatasa alcalina y acidez a partir de manitol permite su clasificación.

La determinación de las especies que integran el Grupo *S. saprophyticus*, observando la Tabla I, se concluye que la determinación de ureasa y acidez a partir de sacarosa y arabinosa es suficiente para establecerlas.

Y finalmente para el Grupo *S. sciurii* con únicamente la determinación de acidez a partir de rafinosa se diferencian.

Hemos encontrado una muy buena reproductibilidad en las determinaciones de fosfatasa alcalina, beta galactosidasa, beta glucosidasa, oxidasa,

TABLA I - Porcentajes de positividad de las pruebas bioquímicas de las 100 cepas de estafilococos coagulasa negativa aislada de materiales clínicos.

	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. auricularis</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. cohnii 1</i>	<i>S. cohnii 2</i>	<i>S. xylosum</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. lentus</i>	
Nº de cepas aisladas	27	3	8	9	5	1	3	21	6	2	2	10	1	1	1	
Crecimiento en Ágar:																
10% CINa	0	66	75	77	0	0	66	90	83	100	100	90	100	100	100	100
15% CINa	0	0	0	11	0	0	0	9	16	50	0	0	100	100	100	0
Crecimiento a 15°C	0	0	0	0	0	0	0	90	83	100	50	90	100	100	100	0
45°C	100	100	87	100	100	100	100	85	50	100	0	80	100	100	0	0
Citocromo c (oxidasa)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Producción de acetoina	100	0	50	78	60	0	0	90	0	0	0	0	100	100	100	0
Producción aeróbica de ácidos desde:																
D-Xilosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0
L-Arabinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0	0
D-celobiosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100
Rafinosa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salicina	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	50	0	0	0	100	100
Sacarosa	100	67	87	89	100	0	67	100	0	0	100	100	0	100	100	100
Maltosa	100	0	87	89	100	0	67	100	50	100	100	0	0	0	0	0
D-Manitol	0	66	75	100	0	0	0	90	16	50	50	90	100	100	100	100
D-Manosa	96	100	0	0	0	100	0	0	67	100	100	70	100	100	100	100
D-Trehalosa	0	0	87	89	100	0	66	100	67	100	100	50	0	100	100	100
Lactosa	50	0	0	78	80	0	0	24	0	50	50	80	0	0	0	0
D-Galactosa	22	0	50	66	40	0	0	6	0	0	0	0	0	100	0	0
β-D-Fructosa	100	100	100	89	100	100	100	100	83	100	100	90	100	100	100	100
D-Melzitosa	7	0	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
D-Ribosa	3	0	25	22	0	0	0	28	0	0	0	0	0	100	100	100
Xilitol	0	0	0	0	0	0	0	33	16	16	0	0	0	0	0	0
Reducción de nitrato	92	0	0	33	80	0	0	42	0	0	50	70	100	100	100	100
Fosfatasa alcalina	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Arginina dehidrolasa	89	0	12	78	40	100	0	0	0	0	0	1	100	0	0	0
Ureasa	100	0	100	0	100	100	0	100	0	100	100	100	0	0	0	0
β-glucosidasa	4	0	87	11	0	0	0	9	0	0	100	10	0	100	100	100
β-glucuronidasa	0	0	25	22	0	0	0	0	0	50	50	10	0	0	0	0
β-galactosidasa (ONPG)	0	0	0	0	0	0	33	9	0	100	100	100	100	100	100	100
Resistencia a novobiocina	0	0	0	0	0	0	0	100	100	100	100	0	0	100	100	100

CUADRO 1 – Pruebas para la identificación de los grupos de especies *Staphylococcus* Coagulasa Negativa.

	Grupo <i>S. epidermidis</i>	Grupo <i>S. saprophyticus</i>	Grupo <i>S. simulans</i>	Grupo <i>S. sciuri</i>
Resistencia a la Novobiocina	–	+	–	+
Beta-galactosidasa	–	±	+	–
Oxidasa	–	–	–	+

Referencias: + : 90% o más cepas positivas
 - : 90% o más cepas negativas

CUADRO 2 – Pruebas de identificación de las especies del grupo *Staphylococcus epidermidis*.

	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. warneri</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. saccharolyticus</i>	<i>S. auricularis</i>
Ureasa	+	–	+	–	+	–
Fosfatasa alcalina	+	–	–	–	–	–
β-glucosidasa	–	–	d	–	–	–
Maltosa	+	–	d	+	–	d
D-Trehalosa	–	–	+	+	–	d
D-Manitol	–	d	d	d	–	–

Referencias: + : 90% o más cepas positivas
 - : 90% o más cepas negativas
 d : 11-89% cepas positivas.

CUADRO 3 – Pruebas de identificación de las especies del grupo *Staphylococcus simulans*.

	<i>S. simulans</i>	<i>S. carnosus</i>	<i>S. carnosus</i>
Ureasa	+	–	–
Fosfatasa alcalina	–	+	–
Manitol	+	+	–

Referencias: + : 90% o más cepas positivas
 - : 90% o más cepas negativas

CUADRO 4 – Pruebas de identificación de las especies del grupo *Staphylococcus saprophyticus*.

	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. cohnii</i> 1	<i>S. cohnii</i> 2	<i>S. xylosus</i>
Ureasa	+	–	+	+
Sacarosa	+	–	–	+
Arabinosa	–	–	–	+

Referencias: + : 90% o más cepas positivas
 - : 90% o más cepas negativas

no así en la producción de ácido aeróbica a partir de los azúcares. Por lo cual los esquemas simplificados que se elaboraron emplean en primer lugar

CUADRO 5 – Pruebas de identificación de las especies del grupo *Staphylococcus sciuri*.

	<i>S. sciuri</i>	<i>S. lentus</i>
Rafinosa	–	+

Referencias: + : 90% o más cepas positivas
 - : 90% o más cepas negativas

dichas pruebas y un mínimo de azúcares.

Por los resultados obtenidos y analizados se concluye que la resistencia a la novobiocina divide a los estafilococos coagulasa negativa en novobiocina sensible: Grupo especies *S. epidermidis* y grupo especies *S. simulans*, novobiocina resistente: grupo especies *S. saprophyticus* y grupo especies *S. sciuri*. Con la detección de beta-galactosidasa (ONPG) se diferencian entre sí los grupos especies (cuadro 1) novobiocina sensible.

Los novobiocina resistente se diferencian por la detección de citocromo C (oxidasa) (cuadro 1).

Estas pruebas constituyen una metodología simple, rápida y accesible a los laboratorios para poder ubicar el germen aislado en uno de los cuatro grupos.

Efectuando otras pruebas complementarias anteriormente analizadas es posible identificar cada especie (Cuadros 2-3-4 y 5).

Este esquema sencillo permite así identificar las especies de estafilococos coagulasa negativa y ayudaría a conocer la diferencia en las sensibilidades a los antibióticos de este grupo de gérmenes en las distintas patologías que causa (2 a 8).

SUMMARY

Identification simplified scheme for coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from human infections

A total of one hundred coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from clinical materials were identified.

Taking into account the DNA homology and the phenotypic characteristics they were divided into two main groups by their novobiocin sensitivity. On the basis of the results of Beta-galactosidase and oxidase test the species were placed into four groups, identified as: *S. epidermidis* species group; *S. simulans* species group; *S. saprophyticus* species group; *S. sciuri* species group, which can be used in any clinical microbiological laboratory.

The simple test of: urease, alkaline phosphatase, β -glucosidase, acid aerobically from maltose, D-trehalose and D-mannitol were used to determine the species of *S. epidermidis* species group.

Generally, due to the major incidence of *S. epidermidis*, urease detection and alkaline phosphatase are enough.

The species of the second group were differentiated by urease detection; alkaline phosphatase and acid aerobically from manitol.

The urease test and the acid aerobically from sacarose and maltose determine the species of the *S. saprophyticus* species group; and only with raffinose, those of the *S. sciuri* species group.

The correlation between the results obtained with these minimal number of conventional tests and those listed in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, showed the applicability of this simple and rapid scheme to differentiate the coagulase-negative *Staphylococcus* species for most bacteriological laboratories.

Key Words: *Staphylococcus*, coagulase-negative, novobiocin, *Staphylococcus* sp

BIBLIOGRAFIA

1. Almedia, R.J. and Jorgensen, J.H. - Use the Mueller Hinton agar to determine novobiocin susceptibility of coagulase-negative *Staphylococci*. *J. Clin Microbiol.*, **16**:1155-1157, 1982.
2. Anderson, J.D., Clarke A.M., Isaac-Renton, J.L., Mac Louglin M.G. - Urinary tract infections due to *Staphylococcus saprophyticus* biotype 3. *Can Med. Assoc. J.*, **124**:415-418, 1984.
3. Archer, G.L., Tenebaum, M.J., Antibiotic-resistant *Staphylococcus epidermidis* in patients under-going cardiac surgery. *Antimicrob. Agents & Chrmoter.* **17**:269-272, 1980.
4. Bungart, S.E., Hall, J.M., Polin R.A. - Sepsis with coagulase-negative *Staphylococci* in critically ill newborns. *Am. J. Dis. Child.*, **137**:461-463, 1983.
5. Florman, A.L., Holzman, R.S. - Nosocomial scalded skin syndrome. *Am. J. Dis. Child.*, **134**:1043-1045, 1980.
6. Frieman, L.E., Brown, A.E. Miller, D.R., Armstrong, D. *Staphylococcus epidermidis* septicemia in children with leukemia and lymphoma. *Am. J. Dis. Child.* **138**:715-719, 1984.
7. Hovelius, B. and Mårdh Per-Anders. - *Staphylococcus saprophyticus* as a common cause urinary-tract infections. *Rev. Inf. Dis.*, **6**:328-337, 1984.
8. Kauffman, C.A., Hertz, C.S. and Sheagren, J.N. - *Staphylococcus saprophyticus*: role in urinary tract infections in men. *The J. Urology*, **130**:493-494, 1983.
9. Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. - Isolation and Characterization of *Staphylococci* from human skin II: descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**:62-79, 1975.
10. Kloos, W.E. and Schleifer, K.H. - Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J. Clin. Microbiol.*, **1**:82-87, 1975.
11. Kloos, W.E., Schleifer, K.H. and Smith, R.F. - Characterization of *Staphylococcus sciuri* s.p. Nov. and its subspecies. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **26**:22-37, 1976.
12. Kloos, W.E. and Jorgensen, J.H. - Manual of Clinical Microbiology 4 th. ed. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1985
13. Mac Faddin, J.F. - Biochemical Tests for Identification of medical Bacteria - Willians and Wilkins Co, 1980.
14. Schleifer, K.H. and Kocur, M. - Classification of *Staphylococci* based of chemical and biochemical properties. *Arch. Microbiol.*, **93**:65-85, 1973
15. Schleifer, K.H. and Kloos, W.E. - Isolation and Characterization of *Staphylococci* from human skin I. amended descriptions of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus* and descriptions of three new species: *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus xylosus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **25**:50 - 61, 1975
16. Schleifer, K.H. - Bergey's manual of sistematic bacteriology, vol 2.9 th ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1985.

Recebido para publicação em 02/04/90

OCORRÊNCIA DE ESTIRPES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* RESISTENTES A OXACILINA EM SERVIDORES HOSPITALARES

Celso Luiz Cardoso¹

João Bedendo¹

Maria Cristina Bronharo²

Luiz Alberto Moribe²

Lourdes Botelho Garcia¹

RESUMO

O estudo da ocorrência de estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes a oxacilina em servidores hospitalares mostrou prevalência de portadores de 14% (16/112). A distribuição de portadores em relação aos sítios amostrados foi: mãos 12%, vestibulos nasais 10%, e orofaringe 2%. Todas as cepas apresentaram-se poli-resistentes. A maioria delas foi classificada no fagogrupo III, incluindo tipos fágicos epidêmicos hospitalares.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, oxacilina, portadores.

INTRODUÇÃO

As infecções hospitalares representam nos dias atuais um grave problema médico-social e o seu melhor conhecimento, prevenção e controle, constituem um desafio a ser enfrentado. Entre os microrganismos associados a etiologia destas infecções, o *Staphylococcus aureus* permanece como importante patógeno, sendo responsável por mais de 10% dos casos de infecções hospitalares (6,11).

Nos últimos anos, a detecção de estirpes de *S. aureus* resistentes a oxacilina (metecilina) tem contribuído para o agravamento desta situação, por se tratar de germes caracterizados por apresentar resistência múltipla aos agentes antimicrobianos usualmente empregados na prática hospitalar (3,12). Diversos autores (4, 14, 18, 19), em diferentes países, têm destacado a importância destas cepas como patógenos hospitalares. No entanto, em nosso meio, trata-se de assunto muito pouco investigado.

Epidemiologicamente, os surtos de infecções causados pelas estirpes de *S. aureus* resistentes a oxacilina são de difícil controle e freqüentemente resultam em infecções graves, sendo os reservatórios hospitalares representados por pacientes infectados ou colonizados, pessoal hospitalar, e o ambiente inanimado (18). A transmissão destas estirpes pelas mãos da equipe médico-hospitalar tem sido apontada por Thompson & col. (18) como importante via de infecção. Casewell & Hill (5), chamam a atenção para a inexistência de estudos detalhados sobre o papel de portadores hospitalares de *S. aureus* resistentes a oxacilina. Estes autores sugerem que a colonização nasal e da orofaringe de profissionais da saúde possa constituir uma fonte para a aquisição nasal destes germes por pacientes não colonizados, a exemplo do que ocorre com as cepas de *S. aureus* sensíveis a oxacilina.

No Brasil a inexistência de publicações relacionadas ao estudo de portadores hospitalares de

-
1. Laboratório de Microbiologia. Departamento de Análises Clínicas. Universidade Estadual de Maringá Caixa Postal 331. CEP 87.001 - Maringá - PR.
 2. Acadêmicos bolsistas do CNPq.

estirpes de *S. aureus* resistentes a oxacilina nos motivou a realizar o presente trabalho, no qual investigamos a ocorrência destes microrganismos nos vestibulos nasais, orofaringe e nas mãos de servidores hospitalares. Os fagótipos e o perfil de resistência aos agentes antimicrobianos dos germes isolados foram também determinados.

MATERIALE MÉTODOS

Casuística - Participaram deste estudo 112 funcionários voluntários pertencentes ao serviço de enfermagem de um hospital geral, de 150 leitos, localizada na cidade de Maringá, PR.

Coleta do material - A amostragem dos vestibulos nasais foi efetuada por meio de "swab" esterilizado, previamente umedecido em solução salina, friccionando-se por 3 vezes o terço inferior de cada vestibulo nasal. Com auxílio de abaixador de língua e usando-se "swab" esterilizado, coletou-se material da região amigdaliana e da parede posterior da orofaringe. A amostragem das mãos foi realizada pelo emprego, com modificações, da técnica do saco plástico proposta por Gaschen (7): as mãos foram introduzidas, uma após a outra, em saco de polietileno transparente (de 150x300x0,05mm), previamente esterilizado por óxido de etileno, contendo 10ml de caldo soja tripticaseína (Biobrás¹) e lavadas durante 30 segundos por massagem dos dedos contra a palma da mão.

Isolamento primário - a) Vestibulos nasais: o material foi suspenso em 0,5ml de caldo soja tripticaseína e homogeneizado por 15-30 segundos em agitador de tubos. Duas alíquotas deste material foram semeadas, respectivamente, com o auxílio de "swab" por técnica de esgotamento, em placas contendo ágar manitol salgado (Biobrás), com e sem oxacilina² (4 µg/ml); b) Orofaringe: utilizou-se técnica semelhante àquela descrita anteriormente, sendo a semeadura, no entanto, efetuada por estrias contínuas em dois planos da superfície do meio de cultura; c) Mãos: volumes de 0,1 ml do líquido de amostragem e da diluição 10⁻², preparada com solução salina, foram respectivamente, semeados com auxílio de bastão de vidro, no ágar manitol salgado com e sem oxacilina. As placas, examinadas diariamente, foram incubadas na estufa a 37°C durante 24 - 48 horas e mantidas à temperatura am-

biente por mais 2 a 3 dias, selecionando-se para estudo 1 a 2 colônias suspeitas (pigmentação, utilização de manitol) por placa.

Identificação das amostras de *S. aureus* - Foi realizada por meio das características morfotintórias e pela evidência da produção de coagulase, utilizando-se a técnica em tubo (10). As culturas puras de *S. aureus* foram estocadas em ágar de manutenção (17) e mantidas em refrigerador.

Antibiograma - Foi efetuado pela técnica de difusão em ágar, sistema de discos (1). Foram testados os seguintes antimicrobianos: amicacina 30 µg, canamicina 30 µg, cefaloridina 30µg, cefoxitina 30µg, cloranfenicol 30µg, eritromicina 15µg, gentamicina 10µg, lincomicina 2µg, oxacilina 1µg, penicilina G 10U, sulfazotrin 25µg, tetraciclina 30µg e vancomicina 30µg. O controle dos testes foi realizado em paralelo empregando-se a cepa padrão de *S. aureus* ATCC nº 25923. A resistência a oxacilina foi confirmada pela determinação da concentração inibitória mínima, utilizando-se o método de diluição em ágar (0,06 a 64µg/ml) por meio da técnica da alça calibrada (20).

Fagotipagem - As amostras de *S. aureus* foram testadas frente aos fagos do conjunto básico internacional: Grupo I - 29, 52, 52A, 79, 80; Grupo II - 3A, 3C, 55, 71; Grupo III - 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 83A, 84, 85; Não classificado - 81; Grupo IV - 95, 96. Os fagos do Grupo Experimental - 86, 88, 89, 90, D11, HK2, foram também incluídos. A tipagem foi realizada na diluição de rotina "1xRTD", e também a "100xRTD" para as amostras bacterianas que não reagiram com a primeira diluição (2).

RESULTADOS

Das 635 colônias suspeitas e selecionadas a partir do isolamento primário 323 (51%) foram identificadas como pertencentes a *S. aureus*. A positividade de isolamento de estirpes resistentes a oxacilina (39/323), por sítio amostrado foi 15% (19/124) para as mãos, 15% (18/117) no caso dos vestibulos nasais e 2,40% (2182) para a orofaringe.

A prevalência de portadores de *S. aureus* resistentes a oxacilina em pelo menos um dos sítios anatômicos estudados foi de aproximadamente 14% (16/112). Oito (50%) destes portadores foram detectados simultaneamente nos dois meios de cultivos empregados; 6 (38%) somente no meio com oxacilina e 2 (13%) apenas no meio sem droga. A distribuição destas cepas em relação a procedência, sensibilidade aos antimicrobianos e fagotipagem é apresentada na Tabela 1.

1. Biobrás Bioquímica do Brasil S. A., Montes Claros, M. G.
2. Oxacilina Sódica = 873 µg/mg, Laboratório Bristol, São Paulo, SP.

TABELA 1 – Distribuição da procedência, espectro de sensibilidade e fagotipagem de 39 estirpes de *S. aureus* resistentes a oxacilina de 112 servidores¹ hospitalares.

Número de ordem:	Sítios anatômicos estudados	Número das colônias	Sensibilidade aos antimicrobianos ² :	Caracterização dos fagótipos:	Grupos fágicos encontrados	Identidade ³
2	Mãos	11 42	VA, ST. VA, ST, LI, CO.	84/+ N.T. ⁴	III N.T.	A -5
10	Orofaringe	155	VA, ST, LI.	N.T.	N.T.	-
32	Nariz	423	VA.	N.T.	N.T.	-
		534	VA.	N.T.	N.T.	-
	Mãos	427	VA.	54	III	B
		538	VA.	53	III	C
34	Nariz	543	VA, ST, LI, AM.	84/85	III	D
	Mãos	627	VA, ST, LI.	75/84/85	III	D
37	Mãos	456	VA, ST, LI, AM.	29/84	I e III	E
38	Nariz	458	VA, ST, LI, AM.	75/85	III	F
		570	VA, ST, LI, AM.	29/75/ 77/84/85	I e III	G
	Mãos	462	VA, ST, LI, AM.	84/+	III	A
		574	VA, ST, AM.	42E/75/ 83A/84/85	III	H
52	Nariz	735	VA, ST, AM.	84/85	III	D
	Mãos	739	VA, ST, AM.	D11	Exp ⁶	I
76	Nariz	815	VA, ST, CO, AM, TE.	29/75 84/85	I e III III	J L
		759	VA, LI.	85		
	Mãos	822	VA, ST, LI, TE.	29/75/ 84/85/+	I e III	J
		765	VA, ST, CO, AM, TE.	N.T.	N.T.	-
77	Nariz	826	VA, AM	54/85	III	M
	Mãos	769	VA	54	III	B
		828	VA, AM.	54/83A/85	III	M
81	Mãos	840	VA, ST, CO, AM.	84/+	III	A
82	Nariz	843	VA, ST, AM	85/+		L
		774	VA, ST, AM.	29/54/ 75/84/85	III III	N
	Mãos	848	VA, ST, AM.	84/+	III	A
		778	VA, ST.	85	III	L
84	Nariz	865	VA, ST, AM.	42E/+	III	O
		850	VA, LI.	85	III	L
	Mãos	871	VA, LI, AM.	83A/85	III	P
		857	VA, ST, LI, AM.	75/83A/ 84/85	III	P
106	Nariz	1112	VA, ST, LI, AM.	75/77/ 83A/84/85	III	Q
	Mãos	962	VA, ST, LI, AM.	29/75/84/85	I e III	J
107	Nariz	1116	VA, ST, LI.	83A/85	III	P
112	Nariz	982	VA, ST, CO, AM, TE.	85/94/+	III	R
	Orofaringe	1118	VA, ST, CO, TE	83A/85	III	P
	Mãos	1125	VA, LI.	42E/54/75/ 83A/85	III	S T
118	Nariz	1127	VA, ST.	81/6/42E/ 54/83A/85	III e Nc ⁷	

1. Funcionários do serviço de enfermagem. 2. VA= vancomicina, LI= lincomicina, ST= sulfazotrim, AM= amicacina, CO= cloranfenicol, TE= tetraciclina. 3. Letras iguais para amostras idênticas. 4. Não tipável. 5. Não caracterizada. 6. Experimental. 7. Não Classificado.

As estirpes de *S. aureus* apresentaram modelos de resistência com 8 a 12 marcadores relacionados aos 13 agentes antimicrobianos testados. Todas as cepas mostraram-se resistentes aos beta-lactâmicos (penicilina G, oxacilina, cefaloridina, cefoxitina), eritromicina, canamicina, gentamicina e foram sensíveis a vancomicina. A resistência observada para os outros antimicrobianos foi: 90% (tetraciclina); 87% (cloranfenicol), 59% (lincomicina), 44% (amicacina) e 28% (sulfazotrim). A concentração inibitória mínima a oxacilina apresentada por estes microrganismos foi igual ou superior a 8 µg/ml.

Em relação a fagotipagem evidenciou-se que 85% (33/39) das amostras foram lisadas pelos fagos do conjunto básico. Vinte e sete destas cepas foram caracterizadas exclusivamente por fagos do grupo III e 6 amostras foram classificadas pelos fagos do grupo III associados a bacteriófagos de outros grupos (I e Não Classificado). Excetuando-se as 5 cepas de *S. aureus* não tipáveis, verificou-se a ocorrência de 19 diferentes fagótipos (letras A -T) conforme demonstrado na tabela 1. Os servidores hospitalares de números 34, 52; 2, 38, 81, 82; e 76, 82, 84 apresentaram isolamentos de amostras de *S. aureus* pertencentes, respectivamente, aos fagótipos 84/85, 84 e 85. O isolamento de estirpes idênticas, isto é, de mesmo fagótipo, originários dos vestibulos nasais e das mãos foi verificado em quatro portadores (Números 34, 76, 77 e 82).

DISCUSSÃO

Embora seja amplamente reconhecido o papel dos servidores hospitalares como reservatórios ou fontes de infecção na epidemiologia das infecções hospitalares estafilocócicas (15), o mesmo não ocorre em relação às infecções causadas pelas estirpes de *S. aureus* resistentes a oxacilina. Nos surtos a forma de disseminação hospitalar destes microrganismos não se encontra ainda perfeitamente esclarecida. Um possível mecanismo é a veiculação por membros da equipe médico-hospitalar, que apresentam freqüentes contatos com pacientes em diferentes partes dos hospitais (3). Apesar do considerável esforço de pesquisadores de diferentes partes do mundo, o controle, ou melhor ainda, a prevenção das infecções causadas por estes germes permanece um desafio a ser enfrentado por todos aqueles que, de uma forma ou de outra, são responsáveis pelos cuidados dos pacientes hospitalizados (9).

Classicamente o portador de *S. aureus* é caracterizado pelo isolamento de amostras deste microrganismo a partir das narinas anteriores, ou ocasional-

mente das axilas ou períneo (16), e ausência de sinais e sintomas da doença. No presente trabalho, consideramos como portador o indivíduo que apresentou cultura positiva de cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina em pelo menos um dos sítios amostrados: vestibulos nasais, orofaringe, ou mãos. É interessante assinalar que as mãos apresentaram uma significativa positividade de isolamentos, evidenciando a sua importância na veiculação hospitalar destes microrganismos. Este achado é consistente com a observação de que o transporte transitório através das mãos contaminadas do pessoal hospitalar parece ser o mais importante mecanismo de transmissão das estirpes de *S. aureus* resistentes a oxacilina entre pacientes hospitalizados (8, 9, 18).

A maioria dos estudos sobre portadores hospitalares de cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina tem sido realizado por ocasião de surtos e tem demonstrado, de um modo geral, taxas bastante reduzidas de portadores. Nos Estados Unidos, por exemplo, Thompson & col. (18) descreveram que em nove surtos, envolvendo 1600 servidores hospitalares com contato direto com pacientes infectados ou colonizados, a prevalência de portadores nasais foi em média 2%. Durante um surto no Hospital Universitário da Virgínia estes autores detectaram a colonização nasal em apenas 0,4% (2/508) do pessoal hospitalar amostrado. Embora estes dados não possam ser generalizados ou extrapolados para as condições epidemiológicas existentes nos hospitais brasileiros, eles são bastantes inferiores à taxa de 10% de portadores nasais observada, em condições endêmicas, no presente trabalho onde os funcionários estudados foram voluntários.

A resistência múltipla às drogas é uma das características das cepas de *S. aureus* oxacilina resistentes (3,12). No presente estudo este aspecto ficou evidenciado pelos resultados do antibiograma. Merece ser destacado que os servidores hospitalares de números 32, 38, 52, 76, 77, 82 e 106 apresentaram, respectivamente, isolamento de estirpes de *S. aureus* dos vestibulos nasais e das mãos com mesmo perfil de resistência aos agentes antimicrobianos testados. Estes achados podem sugerir o potencial de risco representado pelos portadores nasais de amostras de *S. aureus* resistentes a oxacilina na disseminação deste patógeno hospitalar, particularmente por meio das mãos contaminadas.

De acordo com Brumfitt & Hamilton-Miller (3) as estirpes de *S. aureus* resistentes a metilicina mais comumente implicadas em surtos de infecções hospitalares pertencem ao grupo fágico III, destacando-se especialmente os fagótipos 77, 83A, 84 e 85. Conforme evidenciado neste trabalho,

uma elevada proporção de cepas isoladas foram classificadas no grupo III. As estirpes lisadas pelos fagos 84/85, 84 e 85, considerados epidêmicos hospitalares (3, 6, 13) foram também encontrados neste estudo. A fagotipagem mostrou a presença de cepas idênticas nos vestibulos nasais e nas mãos de quatro servidores hospitalares, o que pode sugerir a origem nasal das amostras isoladas das mãos destes portadores. As implicações epidemiológicas decorrentes desta transmissão devem ser melhor investigadas considerando-se, particularmente, a possibilidade de disseminação, através do pessoal hospitalar, de tipos epidêmicos hospitalares de cepas de *S. aureus* resistentes a oxacilina.

AGRADECIMENTOS

Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Proc. 404362-87.7). Agradecemos a Dra Ana M. Uthida-Tanaka, Dra. Maria A. de Araújo e a Sra. Olga C. de Castro do Laboratório de Fagotipagem, Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP; pela elaboração da fagotipagem.

SUMMARY

Occurrence of oxacilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains in hospital personnel.

The carriage of oxacilin-resistant *Staphylococcus aureus* strains by hospital personnel was studied. The prevalence of carrier rate was 14% (16/112). The distribution of carriers by sites sampled was: hands 12%, anterior nares 10%, and throat 2%. All the strains were multiresistant. Most of them belonged to phage group III. Epidemic phage types were also detected.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, oxacillin, carriers.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 493-496, 1966.
- Blair, J.E. & William, R.E.O. Phage typing of *Staphylococci*. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 24: 771-784, 1961.
- Brumfitt, W. & Hamilton-Miller, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.*, 320: 1188-1196, 1989.
- Cafferkey, M.T.; Coleman, D.; McGrath, B.; Hone, R.; Pomeroy, H.; Ruddy, R. & Keane, C.T. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Dublin 1971-84. *Lancet* ii: 705-708, 1985.
- Casewell, M.W. & Hill, L.R. The carrier state: Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 18(Suppl A): 1-12, 1986.
- Cohen, M. *Staphylococcus aureus*: Biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr.*, 108: 796-799, 1986.
- Gaschen, M. Etude comparative de deux méthodes destinées au prélèvement de la flore microbienne des mains. *Helv. Chir. Acta*, 35: 372-377, 1968.
- Jorgensen, J.H. Laboratory and epidemiologic experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in USA. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 5: 693-696, 1986.
- Keane, C.T. & Cafferkey, M.T. Re-emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* causing severe infection. *J. Infect.*, 9: 6-16, 1984.
- Mac Faddin, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Baltimore, Williams & Wilkins, p. 41-52, 1976.
- Maki, D.G. Control of colonization and transmission of pathogenic bacteria in the hospital. *Ann. Intern. Med.*, 89 (Part 2): 777-780, 1978.
- Maple, P.A.C.; Hamilton-Miller, J.T.M. & Brumfitt, W. World-wide antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* i: 537-540, 1989.
- Marples, R.R.; Richardson, J.F. & de Saxe, M. J. Bacteriological characters of *Staphylococcus aureus* submitted to a reference laboratory related to methicillin-resistance. *J. Hyg. (Camb.)*, 96: 217-223, 1986.
- Melo-Cristino, J.A.G.; Pereira, A.T.; Afonso, F. & Naidoo, J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 6-month in a Lisbon paediatric hospital. *J. Hyg. (Camb.)*, 97: 265-272, 1986.
- Nahmias, A.J. & Eickhoff, T.C. Staphylococcal infections in hospitals. Recent developments in epidemiologic and laboratory investigation. *N. Engl. J. Med.*, 265: 74-81, 1961.
- Sheagren, J.N. *Staphylococcus aureus*. The persistent pathogen (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, 310: 1368-1373, 1984.
- Suassuna, I.; Suassuna, I.R.; Ricciardi, I.D. & Formiga, L.C.D. Efficacy of some simple method for long-term preservation of bacterial cultures. *Rev. Microbiol.*, 8: 16-20, 1977.
- Thompson, R.L.; Cabezudo, I. & Wenzel, R.P. Epidemiology of nosocomial infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Ann. Intern. Med.*, 97: 309-317, 1982.
- Varaldo, P.E.; Cipriani, P.; Focá, A.; Geraci, C.; Giordani, A.; Madeddu, M.A.; Orsi, A.; Pompei, R.; Prenna, M.; Repetto, A.; Ripa, S.; Rosselli, P.; Russo, G.; Scazzocchio, F. & Stassi, G.; Identification clinical distribution, and susceptibility to methicillin and 18 additional antibiotics of clinical *Staphylococcus* isolates: nationwide investigation in Italy. *J. Clin. Microbiol.*, 19: 838-843, 1984.
- Washington II, J.A. Susceptibility tests: agar dilution, p. 967-971. In: E.H. Lennette, A. Balows, W.J. Hausler Jr. and H.J. Shadomy (ed). Manual of clinical microbiology, 4th ed, Washington D.C., American Society for Microbiology, 1985.

Recebido para publicação em 10/01/90

HETEROTROPHIC BACTERIA ASSOCIATED WITH THE SHRIMP *PENAEUS SCHMITTI*, SEDIMENT AND WATER OF SEPETIBA BAY, RIO DE JANEIRO, BRAZIL

Fernando Carlos Pagnocca¹
Leda Cristina Mendonça Hagler²
Allen Norton Hagler²

SUMMARY

Samples were collected at the town of Pedra de Guaratiba from the beach (site 41), 2 km offshore (site 42), and from a commercial fishing area in the southwestern part of Sepetiba Bay (site 40). Populations of heterotrophic bacteria in water were highest at the more polluted site 41 with 3.1×10^4 and lower at site 42 with 6.5×10^2 colony forming unite (CFU)/ml. Counts of presumptive *Vibrio* had the same pattern with 5.8×10^2 CFU/ml at site 41 and 6.0×10^1 at site 42. No significant differences were noted in fungal counts at sites 41 and 42 (6.4 and 3.0/ml). Counts of heterotrophic bacteria and presumptive *Vibrio* in shrimp intestines were 7.6×10^9 and 6.5×10^7 CFU/g in the cleaner site, and were 9.5×10^7 and 7.2×10^9 CFU/g at site 41. Microbial counts in sediment of site 41 were about 10 times greater than those water. The prevalent bacteria in all material studied were gram-negative rods including species of the genera *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, and *Acinetobacter*. Most isolates from the shrimp intestines were *Pseudomonas*, but no species could be considered specifically associated with this niche.

Key Words: heterotrophic bacteria, shrimp, sediment, water, *Penaeus schmitti*, coliforms.

INTRODUCTION

Sepetiba Bay is a shallow semi-enclosed estuarine complex with an area of 519 km², and has characteristics that favor reproduction of many marine animals. These waters receive both domestic and industrial sewage at various points, but the bay is heavily used for various types of recreation including bathing and for commercial fishing. The white shrimp, *Penaeus schmitti*, is intensively fished from these waters and marketed mostly in the city of Rio de Janeiro.

Little is known about the symbiotic microbiota of the intestinal tract of crustacea, especially those

of tropical waters. However, the sanitary and organoleptic quality of shellfish is influenced by their feeding habits, and by the microbes in their environment (3, 12, 13). The bacteria associated with marine crustaceans are mostly gram-negative of the *Acinetobacter-Moraxella*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, and *Achromobacter* groups (11, 16, 18, 29, 31). Can (4,5) observed differences between the microbiota of cold and tropical waters. Yasuda & Kitao (33) studied the microbiota associated with the digestive tract of the shrimp *Penaeus japonicus* and noted the occurrence of qualitative and quantitative variations in accord with the stage of development, and there may have been a positive selection for

1. Instituto de Biociencias, Dept. de Bioquímica e Microbiologia, P.O. Box 178, UNESP Rio Claro, SP, 13500, Brazil
2. Instituto de Microbiologia, CCS, Bloco I, Universidade do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, 21944, Brazil

Pseudomonas in the intestine of the host in relation to its environment. In a previous paper we verified that the digestive tract of the white shrimp had a yeast population that reflected the degree of pollution of its location of capture (23). In this paper we describe the heterotrophic bacterial population of the shrimp *P. schmitti* and some substrates of its natural environment in Sepetiba Bay.

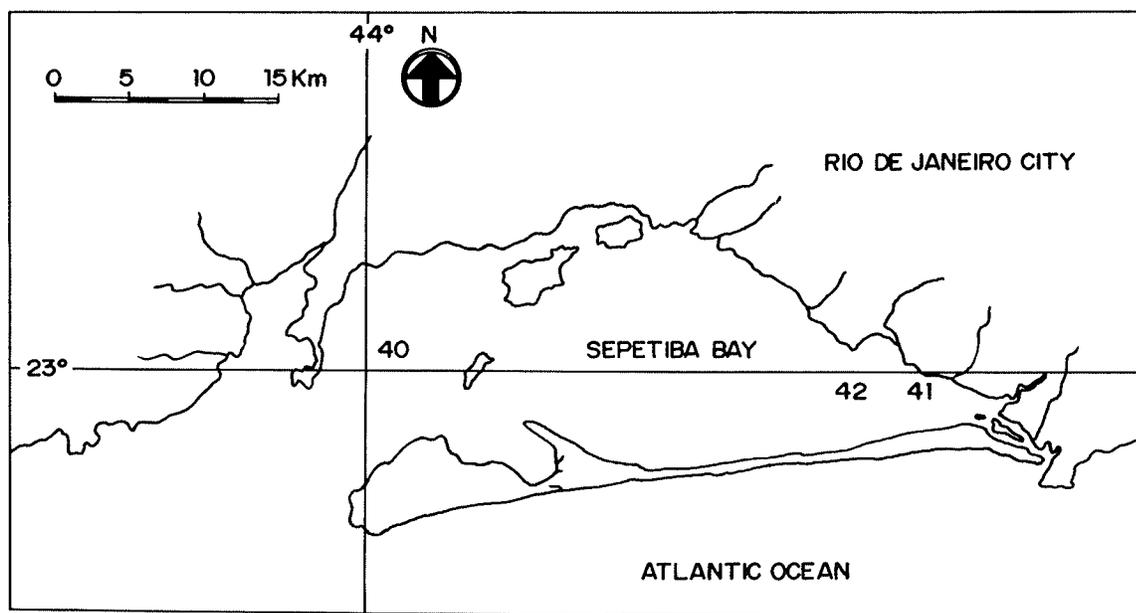
METHODS

Samples were collected at 3 sites (Fig.1): at the beach of the town of Pedra de Guaratiba (site 41), about 2 km offshore from Pedra de Guaratiba (site 42), and from commercial fishing areas near the mouth of Sepetiba Bay (site 40). Water samples were taken with sterile wide mouthed bottles, and sediment with sterile test tubes, and processed as described previously (8, 9). Shrimp were collected at high tide with nets from site 41 or separated aseptically from commercial catches at the time of capture at site 40. Samples were transported on ice to the laboratory for analysis within 12 hr for site 40 and 5 hr for other sites. Groups of 5 to 15 shrimp were weighed, measured and their intestines aseptically removed. Intestines were weighed and homogenized aseptically in sterile saline (0,85% NaCl) peptone (0,1%) water with a sterile tissue grinder. Heterotrophic bacteria counts were determined in triplicate by the spread plate method on

Standard Plate Count agar (Difco) with NaCl adjusted to 1%, and incubated for 3 days at $26 \pm 2^\circ\text{C}$. and on Marine agar (Difco) spread plates incubated 5 to 7 days at $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Counts of presumptive *Vibrio* spp. were made on TCBS agar incubated for 3 days at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ by the spread plate method. Cultures were isolated for identification from selected representative colonies that grew on these media. Fungi were counted by the most probable number method in Aquatic yeast medium (6% glucose, 3.5% NaCl, 0.5% yeast extract, 0.5% ammonium sulphate, 0.2 monobasic sodium phosphate, chloramphenicol 200mg/l, and pH adjusted to 4.5) after 1 and 2 weeks incubation at $26 \pm 2^\circ\text{C}$ (23). Fecal coliforms were counted by the most probable number method of the American Public Health Association as described previously (10, 23). Bacterial isolates were maintained on agar slants of their isolation media under sterile mineral oil in screw capped tubes at 4 to 10°C . Characterization and identification of gram-negative bacteria was done with the Minitek system (BBL) and nomenclature made in agreement with Bergey's manual (2).

RESULTS

Mean water temperatures were $25.3 \pm 4.5^\circ\text{C}$ at site 41 and $23.8 \pm 1.8^\circ\text{C}$ at site 42, and salinity 25.9 ± 3.3 and 29.3 ± 1.0 g/l respectively. These conditions were typical of a tropical estuary. Mean



sizes of shrimp varied in the different collections ranging from 7.7 ± 2.6 to 28.3 ± 15.6 g, and lengths of 9.4 ± 1.0 to 15.2 ± 2.2 cm at site 40; and from 4.2 ± 1.4 to 11.3 ± 3.9 g, and 7.8 ± 0.8 to 11.3 ± 1.4 cm at site 41. Geometric means of microbial counts are presented in Table 1. Heterotrophic bacteria counts made on Marine agar and Plate

Count agar were similar for material collected from shore site 41. Both nonselective media allowed isolation of diverse strains from a dense bacterial population, independent of the material analysed. Counts of heterotrophic bacteria, presumptive *Vibrio* spp., and fungi were higher at site 41, an observation consistent with the higher level of

TABLE 1 - Geometrics means of microbial counts per ml of water, g wet weight of sediment and gram wet weight of intestines of shrimp from Sepetiba Bay, Rio de Janeiro. The number of samples is indicated in parenthesis.

Symbols: PCA = Plate Count Agar supplemented with 1% NaCl;
MA = Marine Agar.

Site	Substrate	Heterotrophic Bacteria		Presumptive Vibrio	Fecal Coliforms	Fungi
		PCA	MA			
40	Shrimp Intestine (6)	7.6×10^9	1.1×10^{10}	6.5×10^7	$<2.0 \times 10^1$	2.4×10^2
41	Shrimp Intestine (4)	9.5×10^7	1.4×10^8	7.2×10^6	5.7×10^2	1.9×10^3
41	Sediment (9)	4.7×10^5	4.2×10^5	6.6×10^3	1.4×10^2	1.9×10^2
41	Water (10)	3.1×10^4	3.8×10^4	5.8×10^2	8.7×10^0	6.4×10^0
42	Water (7)	6.5×10^2	1.1×10^3	6.0×10^1	2.3×10^{-1}	3.0×10^0

TABLE 2 - Species of gram-negative bacteria, and number of isolates from shrimp intestines, sediment, and water of Sepetiba Bay.

Species	Number of Isolates		
	Shrimp Intestine	Sediment	Water
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	8	3	3
<i>Alcaligenes denitrificans xylosoxidans</i>	1	0	0
<i>Alcaligenes</i> spp	4	1	3
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	4	0	2
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2	0	0
<i>Flavobacterium</i> sp	3	0	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	1	3
<i>Moraxella phenylpyruvica</i>	4	2	2
<i>Moraxella</i> spp	13	17	11
<i>Moraxella</i> or <i>Acinetobacter</i>	3	0	0
<i>Providencia alcalifaciens</i>	0	1	0
<i>Providencia rettgeri</i>	1	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	0	0
<i>Pseudomonas cepacia</i>	0	0	1
<i>Pseudomonas diminuta</i>	4	0	0
<i>Pseudomonas fluorescens/puvida</i>	2	0	1
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	0	0	1
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	6	1	3
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	3	1	3
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	0	0
<i>Pseudomonas</i> spp	5	0	0
<i>Vibrio alginolyticus</i>	3	6	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	2	2	1
<i>Vibrio</i> sp	1	1	0
Not Identified	22	9	15
Total (194)	97	45	52

organic pollution. Water and sediment samples could not be taken at site 40, but since fecal coliforms were concentrated in shrimp at site 41 and were undetected in shrimp from site 40, the water at this offshore site should have been free of recent fecal pollution. Fecal coliform counts at site 42 showed a notably lower level of fecal pollution than that found at the beach site 41. Counts of heterotrophic bacteria in shrimp intestines were much higher in shrimp from cleaner offshore waters of site 40 than from those from polluted water at site 41. We found presumptive *Vibrio* counts in water at site 41 to be about 10 times greater than at site 42 showing a positive correlation with coliform levels. Coliform counts had more than a 100 fold difference between these two sites.

Of the bacteria isolated on nonselective media, 25.4% from shrimp intestines were gram-positive (20 rods and 32 cocci), 23.3% from water were gram-positive (34 rods and 55 cocci), and 16.7% from sediments were gram-positive (1 coccus and 8 rods). Results of identification of selected cultures of gram-negative bacteria are noted in Table 2, and showed that the prevalent bacteria were of the genera *Moraxella*, *Pseudomonas*, and *Vibrio*. These were isolated in similar proportions independent of origin from shrimp intestine, sediment, or water. The isolates from the TCBS agar medium used for selective counts of presumptive *Vibrio* had a diversity similar to those from non-selective media and are also included in Table 2. Of the bacteria we isolated, 25% were not identified by the Minitek system and could have included new species.

DISCUSSION

Microbial counts in the shrimp intestines, sediments, and water could be compared directly at site 41, and showed populations 10^3 to 10^4 times more concentrated in the intestines than in water for heterotrophic bacteria, presumptive *Vibrio*, and fungi, but only 65 times more concentrated for fecal coliforms. All bacterial counts were about 10 times more concentrated in sediments than in water. Fecal coliform bacteria in these and other waters of Rio de Janeiro have been shown to be mostly *Escherichia coli* and other enteric bacteria typical of feces of warm blooded animals (10). Although they were accumulated in similar proportion to other microbes in sediments, coliforms were less concentrated in the shrimp intestines; probably reflecting poor survi-

val in this microenvironment.

The food materials concentrated in the intestines of marine animals can serve as a source of nutrients for symbiotic heterotrophic populations, and these can be of nutritional importance to the host organism by producing enzymes that help in digestion or by supplying part of its nutrients (3). Benthic animals from the Atlantic Ocean have microbial populations ranging from 2×10^2 to 2×10^8 CFU/g intestinal material (21), and cells associated with fecal particles were shown capable of intense proliferation when this material is excreted into the environment (26). The concentrations of these microbes in excreted feces were 10^5 to 10^6 times higher than those encountered in water. Specific microbial populations have been detected in the intestines of some fishes, most notably in those with complex digestive systems (28). The higher counts of heterotrophic bacteria in intestines of shrimp from the offshore site 40 were not clearly connected with other parameters like size, age, weight, or availability of food. This may indicate the presence of a well adapted population of marine bacteria that were not able to establish themselves in the intestines of shrimp in more polluted water. Allochthonous bacteria from terrestrial sources may accumulate in the intestines of shrimp in polluted sites, but be unable to survive as well in this situation as the more autochthonous populations of unpolluted sites. It is possible that the proportion of anaerobes was higher in the more polluted site, but were not detected by our methodology that was limited to counts of aerobes and facultative organisms. An unexpectedly high population of heterotrophic bacteria has also been observed recently in mussels of the species *Perna perna* collected from relatively clean waters of Rio de Janeiro (17). The large numbers of allochthonous bacteria and other materials of terrestrial origin may interfere with establishment of normal intestinal microbiota of benthic organisms in polluted waters.

Fungal counts are not normally used as pollution indicators, but correlation with pollution has been reported for fresh-water (7,30). Although coliform levels were notably different, there was no significant difference between the fungal counts at sites 41 and 42. Microbial populations including fungi were higher in sediments than in water as was also noted by Niemi (20). This was consistent with a higher concentration of organic materials and source of nutrients for microbial populations expected in sediments. Fungal populations in shrimp intestines were notably higher than in sedi-

ment at site 41 as expected by the detritus feeding habit of this crustacean. This was in accord with the idea that the microbiota of aquatic animals is basically determined by their environment and the type of food they consume as suggested by Horsley (13), Potter and Baker (24), and Trust and Sparrow (29).

Vibrio and *Vibrio* like organisms are ubiquitous in nature and includes some species pathogenic to man that can be disseminated by some types of marine fauna (1, 6, 14, 15, 22, 25, 26). Hagler *et al.* (10) found a high correlation between counts of presumptive *Vibrio* and other microbial parameters including fecal indicators in waters of Rio de Janeiro, but other studies have not found such correlations (6, 22). *Vibrio spp.* are sensitive to variations in temperature (1, 15), salinity and pollution levels (6, 14). We did not isolate *Vibrio parahaemolyticus* on TCBS agar, and neither did Rodrigues and Hoffer, (25). The high correlation of presumptive *Vibrio* counts noted previously by us may have been the result of poor selectivity of TCBS agar in waters of Rio de Janeiro. *Vibrio cholera* was present in the study of Rodrigues and Hoffer (25), and isolated previously from Guanabara Bay (10), but not detected by us in this study. Maybe *V. cholera* and *V. parahaemolyticus* strains were present, but in numbers too low to be detected by the methods we used for isolation of prevalent species.

Of 28 cultures of *Pseudomonas* species, 75% originated from shrimp intestines suggesting this as a microenvironment with positive selection for this group. In general our data confirmed the predominance of *Acinetobacter-Moraxella* (*Achromobacter*) and *Pseudomonas* observed by Shiflet *et al.* (27), Vanderzant *et al.* (31,32), and Harrison and Lee (11). The enteric bacteria isolated on non-selective media were not species considered to be of exclusive fecal origin. About 2/3 of the heterotrophic bacteria we isolated from shrimp came from site 40 and although Enterobacteriaceae were included they probably had little sanitary significance, and the lack of fecal coliforms in shrimp captured from offshore waters agreed with this. In contrast, fecal coliforms were present in shrimp from polluted water, and isolates from coliform tests included *Escherichia coli* (unpublished data), a species considered to be highly specific for feces of warm blooded animals. The bacterial population of the shrimp intestine reflected that of its environment and was affected by the fecal pollution level of the water from which they were collected.

ACKNOWLEDGEMENTS

We acknowledge the dedicated technical assistance of Olavo Jacinto do Nascimento and Ivan Candido da Silva, and the Financial support of FINEP and CNPq.

RESUMO

O ambiente estudado situa-se na localidade de Pedra de Guaratiba, próximo a cidade do Rio de Janeiro e as amostras foram coletadas na praia (local 41), aproximadamente 2 km mar adentro (local 42) e próximo a uma área de pesca na região sudeste da Baía de Sepetiba. No local mais poluído (local 41) as contagens de bactérias heterotróficas na água atingiram o valor de 3.1×10^4 UFC/ml, enquanto que no local 42 obteve-se 6.5×10^2 UFC/ml. As contagens presuntivas de *Vibrio* foram de 5.8×10^2 UFC/ml no local 41 e 6.0×10^1 no local 42. As contagens de fungos foram muito semelhantes nestes locais, correspondendo a 6.4 NMP/ml no local 41 e 3.0 NMP/ml no local 42. As amostras de tubo intestinal de camarões coletados no local mais limpo (local 40) apresentaram respectivamente populações de 7.6×10^9 e 6.5×10^7 UFC/g para as bactérias heterotróficas e contagens presuntivo de *Vibrio*, enquanto que os mesmos parâmetros obtidos para camarão capturado no local 41 foram 9.5×10^7 e 7.2×10^6 UFC/g. As populações microbianas determinadas no sedimento coletado no local 41 foram 10 vezes superiores as contagens na água. As bactérias gram-negativas em forma de bastonetes e não-fermentadoras foram prevalentes em todas as amostras e a maioria foi identificada como pertencente aos gêneros *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, e *Acinetobacter*. Várias culturas de *Pseudomonas* foram isoladas em tudo intestinal do camarão *Penaeus schmitti*, mas nenhuma espécie em particular pareceu estar associada especificamente a este nicho.

Palavras-chave: Bactérias heterotróficas, camarão, sedimentos, *Penaeus schmitti*, coliformes.

REFERENCES

1. Baross, J., & Liston, J. - Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic *Vibrios* in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.*, 20: 179-186, 1970.
2. Bucham, R. E. & Gibbons, N. E. (Eds.) - *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore, 964 pp, 1984.

3. Cahill, M. M. - Bacterial flora of fishes: A Review. *Microbial Ecology*, **19**: 21-41, 1990.
4. Cann, D. C. - *Bacteriological aspects of tropical shrimp*. Food and Agricultural Organization Technical Conference on Fishery Products, Tokyo, Japan, 1973.
5. Cann, D. C. - The bacteriology of shellfish with reference to international trade. In *Handeling, Processing, and Marketing of Tropical Fish*. Tropical Products Institute, London, pp 377-394, 1977.
6. Colwell, R. R.; Kaper, J. & Joseph, S. W. - *Vibrio cholera*, *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrios*: Occurrence and distribution in Chesapeake Bay. *Science*, **198**: 394-396, 1977.
7. Cooke, W. B. - Fungi in sewage. In *Recent Advances in Aquatic Mycology*, E. B. Gareth Ed., Halsted Press, New York, p. 389-434, 1976.
8. Hagler, A. N. & Mendonça-Hagler, L. C. - Yeasts from marine and estuarine waters with different levels of pollution in the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41** : 173-178, 1981.
9. Hagler, A. N., de Oliveira, R. B., & Mendonça-Hagler, L. C. - Yeasts in the intertidal sediments of a polluted estuary in Rio de Janeiro, Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*, **48**: 53-56, 1982.
10. Hagler, A. N.; Mendonça-Hagler, L.C.; Santos, E.A.; Farage, S.; Filho, J.B.S. & Schank, A. - Microbial pollution indicators in Brazilian tropical and subtropical marine surface waters. *Science Tot. Environ.*, **58**: 151-160, 1986.
11. Harrison, J. M. & Lee, J. S. - Microbiological evaluation of Pacific shrimp processing. *Appl. Microbiol.*, **18**: 188-192, 1968.
12. Hobbs, G. & Hodgkiss, W. - The bacteriology of fish handling and processing. In *Developments in Food Microbiology*, R. Davies Ed., *Appl. Sci. Pub. England*, pp 71-117, 1981.
13. Horsley, R. W. - Review of the bacterial flora of teleosts and elasmobranchs, including methods for its analysis. *J. Fish. Biol.*, **10**: 529-533, 1977.
14. Kaper, J.; Lockman, H.; Colwell, R. R., & Joseph, S. W. Ecology serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholera* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 91-103, 1979.
15. Kenyon, J. E.; Peixoto, D. R.; Austin, B. & Duncan, C.G. - Seasonal variation in numbers of *Vibrio cholera* (non-01) isolated from California coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**: 1243-1245, 1984.
16. Koburger, J. A.; Norden, A. R., & Kempler, G. M. - The microbial flora of rock shrimp - *Sicyonia brevirostris*. *J. Milk Food Technol.*, **38**, 1747-749, 1975.
17. Kosawa da Costa, A. M.; Sanchez-Nunez, M. L.; van Weerelt, M. D. M.; Faria, G. V. F.; Mendonça-Hagler, L.C.; & Hagler, A.N. - Microbial quality of the mussel *Perna perna* (Linne, 1758) Extracted from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brasil, Costal Zone 91, Long Beach, 1991, in press.
18. Leitão, M. F. F. - Microbiologia e deterioração do pescado fresco e refrigerado de origem fluvial ou marinha. In *Seminário Sobre Controle de Qualidade na Indústria de Pescado*, Kai, M. & Ruivo, U. E. eds., Leopoldianum Editora, Santos, SP, pp. 40-58, 1988.
19. Lee, J. S. & Pfeifer, D. K. - Microbiological characteristics of pacific shrimp (*Pandalus jordani*). *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 853-859, 1977.
20. Niemi, R.N. - Actinomycetes and fungi in surface waters and in potable water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**: 378-388, 1982.
21. Ohawa, K.; Tabor, P. S. & Colwell, R. R. - Species composition and barotolerance of gut microflora of deep-sea macrofauna collected at various depths in the Atlantic Ocean. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 746-755, 1980.
22. Oliver, J. D.; Warner, R. A. & Cleland, D. R. - Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose fermenting marine *Vibrios* in coastal waters of the Southeastern United States. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**: 1404-1414, 1982.
23. Pagnocca, F. C.; Mendonça-Hagler, L. C. & Hagler, A. N. - Yeasts associated with the white shrimp *Penaeus schmitti*, sediment, and water of Sepetiba Bay, Rio de Janeiro, Brazil. *Yeast*, **5**: 479-483, 1989.
24. Potter, L. F. & Baker, G.E. - The role of fish as conveyors of microorganisms in aquatic environments. *Can. J. Microbiol.* **7**: 595-605, 1961.
25. Rodrigues, D. & Hoffer, E. - *Vibrio* species from the water-oyster ecosystem of Sepetiba Bay in Rio de Janeiro State, Brazil. *Rev. Microbiol.* (São Paulo), **17**: 332-338, 1986.
26. Ruby, E. G. & Morin, J. G. - Luminous enteric bacteria of marine fishes: a study of their distribution, densities and dispersion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 406-411, 1979.
27. Sera, H.; Ishida, Y. & H. Kadota. - Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish. In R. R., Colwell and R. Y. Morita Eds, *Effects of the Ocean Environment on Microbial Activities*. pp. 467-490, 1974.
28. Shiflet, M. A., Lee, L. S., & Sinnhuber, R. O. - Microbial flora of irradiated dungeness crabmeat and Pacific oysters. *Appl. Microbiol.*, **14**: 411-415, 1966.
29. Trust, T. J. & Sparrow, R. A. H. - The bacterial flora in the alimentary tract of freshwater salmon fishes. *Can. J. Microbiol.*, **20**: 1219-1228, 1974.
30. Ueda, S. - A mycoflora study on river sediments in Nagasaki, Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, **21**: 495-504, 1982.
31. Vanderzant, C.; Mroz, E. & Nickelson, R. - Microbial flora of Gulf of Mexico and pond shrimp. *J. Milk. Food Technol.*, **33**: 346-350, 1970.
32. Vanderzant, C.; Nickelson, R. & Judkins, P. W. - Microbial flora of pond-reared brown shrimp (*Penaeus aztecus*). *Appl. Microbiol.*, **21**: 916-921, 1971.
33. Yasuda, K. & Kitao, T. Bacterial flora in the digestive tract of prawns, *Penaeus japonicus* Hata. *Aquaculture*, **19**: 229-234, 1980.

Received for publication in 08/01/91

EFICIÊNCIA DE ESTIRPES DE *BRADYRHIZOBIUM SP*, NA FIXAÇÃO DO NITROGÊNIO EM AMENDOIM (*ARACHIS HYPOGAEA L.*)

Maria Luiza C. O. Lombardi*
Patrícia A. de Oliveira*

RESUMO

Testou-se o potencial de fixação de nitrogênio de treze estirpes de *Bradyrhizobium sp* em amendoim, cv. Poitara, em vasos de Leonard com solução nutritiva livre de nitrogênio e em casa de vegetação. A eficiência dessas estirpes foi comparada com a da SMS-400, uma das mais eficientes nessa leguminosa a qual é atualmente recomendada para a produção de inoculantes. Quatro dessas estirpes mostraram alto potencial de fixação do N₂, duas foram medianamente eficientes e três foram completamente ineficientes. Quatro estirpes não formaram nódulos no amendoim, sugerindo que essa leguminosa apresenta maior grau de especificidade hospedeira que pode ser verificado em condições controladas.

Palavras-chave: amendoim, *Bradyrhizobium sp.*, fixação do nitrogênio.

INTRODUÇÃO

Leguminosas tropicais como o amendoim apresentam-se intensamente noduladas pela população nativa de *Bradyrhizobium spp* (6). Para DATE (3), o amendoim se enquadra entre as plantas altamente promíscuas que, na classificação antiga da família *Rhizobiaceae*, nodula com os rizóbios tipos "cowpea". No entanto, mesmo dentro desse grupo de leguminosas tropicais existem aquelas com maior especificidade, conforme apresentado pelo mesmo autor. Embora essa nodulação abundante possa indicar baixa especificidade hospedeira, Burton (2) já a observou em amendoim e trabalhos realizados por Lopes & col. (5) e Giardini & col. (4) confirmaram esses fatos.

Em termos de eficiência intrínseca, tem-se encontrado grande variação entre isolados provindos de diferentes leguminosas, desde a formação de nódulos altamente eficazes até aqueles totalmente ineficientes (4). A seleção de isolados que produzam nódulos eficientes em leguminosas é de grande inter-

esse agrícola, uma vez que através de sua inoculação pode-se substituir a adubação nitrogenada. Portanto, isolados inicialmente selecionados para essa característica devem ser posteriormente estudados quanto a outros atributos desejáveis, que possam contribuir para o aumento da produtividade da cultura.

No presente trabalho procurou-se testar a eficiência em fixar o nitrogênio e a especificidade hospedeira no amendoim de isolados de *Bradyrhizobium sp* locais ou não, originados de várias leguminosas.

MATERIAL E MÉTODOS

Conduziu-se o experimento em casa de vegetação, em vasos de Leonard com solução nutritiva livre de nitrogênio, conforme técnica recomendada por Somasegaran & col. (9). Utilizou-se o amendoim cultivar Poitara.

Antes do plantio as sementes foram desinfetadas com hipoclorito de sódio comercial, em

* Instituto Agronômico de Campinas, Seção de Microbiologia do Solo, Caixa Postal 28 CEP-13001 - Campinas, SP

solução 1:3 (hipoclorito:água), durante 2 minutos e lavadas com água esterilizada. O plantio realizou-se em 18/12/89. Em cada vaso foram colocadas 4 sementes, número que após o desbaste, aos 5 dias do plantio, foi reduzido para 1 planta.

Testaram-se 13 estirpes da coleção de *Bradyrhizobium* do Instituto Agrônomo (9), cujas eficiências foram comparadas com a da SMS-400 que é a estirpe atualmente recomendada para a produção de inoculantes para essa cultura, conforme determinado na 4ª reunião da Rede de Laboratórios de Recomendação de Estirpes (RELARE, Brasília, 1990 — Ata da Reunião). As estirpes utilizadas, bem como o local e a planta de origem foram as seguintes:

Brasil: SMS-129, isolada de crotalaria (*Crotalaria* sp); SMS-319 isolada de siratro (*Macropitium atropurpureum*); SMS-484 e SMS-729, de amendoim (*Arachis hypogaea*).

Zimbabwe: SMS-400 (=411 MAR) e SMS-438 (=468 MAR), ambas isoladas de amendoim.

Líbia: SMS-633 (=BR-2001; =SEMIA-6145, =CJ-1, isolada de *Crotalaria juncea*).

Estados Unidos: SMS-437 (=555 CRB); SMS-519 (=TAL-1000). SMS-527 (=Nitragin-886), SMS-528 (Nitragin-8A-11), isolada de amendoim e SMS-567 (=Nitragin-32H1), de *Crotalaria paulina*.

Bolívia: SMS-561 (=NC-92) isoladas de amendoim.

As estirpes foram inoculadas com 1 ml/planta de uma suspensão de células em meio líquido, contendo aproximadamente 10^8 cels./ml. A inoculação deu-se no dia seguinte ao desbaste.

Foram feitos 2 controles sem inoculação, sendo um sem nitrogênio e outro com o elemento, sendo este adicionado semanalmente em solução de NH_4NO_3 0,18M. Desse modo cada planta controle recebeu 275 mg de N.

Repetiu-se cada tratamento 5 vezes e distribuíram-se os vasos inteiramente ao acaso. Os vasos foram redistribuídos por sortício a cada 15 dias. A solução nutritiva foi renovada 2 vezes durante o experimento. As plantas foram pulverizadas semanalmente com Thiodam, em dose equivalente a 1,5ml/1H₂O, para prevenção ao ataque de ácaros. A colheita procedeu-se 50 dias após a inoculação. Nessa fase fisiológica inicia-se a formação das vagens. No experimento as plantas mais desenvolvidas tinham algumas vagens formadas, e outras em formação o que não ocorreu nos tratamentos com plantas pouco desenvolvidas.

A parte aérea das plantas foi separada das raízes, lavada, seca a 65°C e depois pesada. Foi também moída para determinação do nitrogênio

total, a qual foi feita segundo metodologia recomendada por Bataglia & Cols. (1). Das raízes destacaram-se os nódulos para contagem, secagem e pesagem. A partir das quantidades de nitrogênio total contidas na parte aérea, calculou-se a eficiência relativa (ER) de cada estirpe, sendo essa o percentual de N₂ fixado em relação ao controle que recebeu nitrogênio mineral (ER = N₂ fixado/N mineral) x 100.

Os resultados foram analisados estatisticamente segundo um esquema inteiramente casualizado, utilizando-se o teste de Tukey para comparação das médias dos tratamentos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 13 estirpes de *Bradyrhizobium* utilizadas, apenas 10 formaram nódulos no amendoim (Tabela 1). As SMS-129, SMS-424, SMS-633 e SMS-519 não nodularam as plantas. É interessante observar que dessas 4 estirpes, as 3 primeiras foram isoladas do gênero *Crotalaria* e a SMS-519 do próprio amendoim. Esses resultados, não podem ser conclusivos, mas estão de acordo com aqueles de Burton (2), Giardini & col.(4) e Lopes & col. (5) que observaram especificidade hospedeira nessa leguminosa.

TABELA 1 - Peso e número de nódulos e quantidade de nitrogênio fixado por unidade de massa nodular, em amendoim cv. Poitara, cultivado em vasos de Leonard, com solução nutritiva sem nitrogênio e colhido aos 50 dias do plantio. Médias de 5 repetições.

Tratamento	Nódulos*		mg N/Mg de Nódulo/planta
	mg/planta	nº/planta	
SMS - 129	0,0	0,0	—
SMS - 319	11,7	14,5	0,16
SMS - 400	13,8	14,3	1,24
SMS - 424	0,0	0,0	—
SMS - 437	9,9	3,2	0,19
SMS - 438	14,0	11,8	1,35
SMS - 484	22,1	11,1	0,36
SMS - 519	0,0	0,0	—
SMS - 527	16,7	28,6	0,69
SMS - 528	19,2	15,1	0,70
SMS - 561	19,7	17,3	0,42
SMS - 567	16,8	14,6	1,10
SMS - 633	0,0	0,0	—
SMS - 729	19,6	16,9	0,59
DMS (Tukey 0,05)	9,5	9,7	0,30

* Dados transformados para análise e expressos em $\sqrt{x + 1}$

TABELA 2 - Produção de matéria seca, nitrogênio total na parte aérea e eficiência relativa, observados em amendoim cv. Poitara, cultivados em vasos de Leonard, com solução nutritiva sem nitrogênio e colhido aos 50 dias do plantio. Médias de 5 repetições.

Tratamento	Mat. Seca g/planta	Nitrog. Total mg/planta	ER %
SMS - 129	0,9	13,4	—
SMS - 319	1,6	25,3	13,4
SMS - 400	8,6	291,4	152,0
SMS - 424	1,7	22,8	—
SMS - 437	1,6	24,3	12,8
SMS - 438	8,3	264,6	138,7
SMS - 484	6,3	167,2	86,4
SMS - 519	1,8	25,7	—
SMS - 527	6,1	192,7	98,2
SMS - 528	7,7	198,5	104,3
SMS - 561	3,6	71,2	45,7
SMS - 567	7,8	263,7	137,7
SMS - 633	1,4	21,1	—
SMS - 729	8,8	236,9	123,5
Controle	1,6	21,0	—
Contr. + Nitr.	8,3	174,6	—
DMS (Tukey 0,05)	2,3	89,11	60,2

Das estirpes que nodularam o amendoim, apresentaram alto potencial de fixação de N₂ a SMS-438, a SMS-527, SMS-567 e SMS-729, que se mostraram tão eficientes quanto a SMS-400. Esse fato está claramente mostrado na Tabela 2, onde se observa maiores quantidades de matéria seca e nitrogênio total nos tratamentos em que foram inoculadas essas estirpes, e tendo também maiores eficiências relativas em relação às outras estirpes. Considerando a eficiência relativa, essas estirpes mostraram-se em média em torno de 37% mais eficientes que o tratamento com nitrogênio. Até aos 50 dias da inoculação, época em que se deu a colheita, dos 275,0 mg de nitrogênio adicionados, no tratamento controle as plantas tinham absorvido 174,6 mg do elemento, ou seja, o equivalente a 63,0% do total.

Outro critério que pode ser utilizado para avaliar a eficiência de estirpes é a quantidade de N₂ fixada por unidade de massa nodular (8) (Tabela 1).

Esse modo de avaliação pode ser até mais rigoroso, pois estirpes que não diferiram quanto a produção de matéria seca, diferiram nas quantidades de nitrogênio fixado por mg de nódulos produzidos (Tabela 1). Também esse parâmetro mostrou alta correlação com a eficiência relativa ($r = 0,90$) e com a quantidade de matéria seca produzida ($r = 0,79$). O coeficiente de determinação mostrou que 81% da variação da eficiência relativa e 62% da variação da matéria seca, está estreita-

mente relacionada com a variação da quantidade de N₂ fixada/unidade de massa nodular. O número de nódulos e o peso total dos mesmos não se correlacionaram com a eficiência relativa, matéria seca e nitrogênio total na parte aérea.

A SMS-319 e a SMS-561 foram consideradas altamente eficientes em amendoim cv Tatu (4). Os resultados obtidos neste experimento com essas estirpes as quais foram tão ineficientes quanto o controle, podem indicar uma alteração genética em relação a original, uma vez que neste trabalho empregou-se uma subcultura. Pode também tratar-se de preferência por cultivar, pois foram eficientes na cv. Tatu e no ensaio utilizou-se a cv. Poitara.

Em nossas condições tem-se estudado muito pouco a simbiose *Bradyrhizobium*-amendoim e os poucos trabalhos existentes mostram ser essa leguminosa mais específica do que se pensa ou que a nodulação abundante observada em nossas condições de campo se deve a um população de *Bradyrhizobium* sp. espalhada em nossos solos. O fato de SMS-519 não ter formado nódulos e ter sido isolada de amendoim pode sugerir especificidade a nível de cultivar ou a influência de algum fator não controlado no presente experimento. Essa especificidade pode ser considerada a nível de eficiência quando a planta é muito promíscua sendo relatados cultivares e tipos botânicos mais eficientes (10,11).

Esses autores sugerem que a especificidade hospedeira deve ser considerada em estudos de seleção, pois se não se manifesta a nível de infectividade, ocorre através da maior capacidade fixadora entre estirpes/cultivares.

CONCLUSÕES

1. As estirpes SMS-438, SMS-527, SMS-567 e SMS-729, além da SMS-400 mostraram alta eficiência em fixar N₂.
2. As estirpes SMS-319 e SMS-561 se mostraram ineficientes quanto a fixação do N₂, podendo tratar-se de alterações genéticas no microrganismo em relação à cultura original ou a preferência por outras cultivares.
3. O amendoim apresentou nas condições do ensaio certa especificidade hospedeira, que deve ser estudada com mais detalhes.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida às autoras. À bióloga Lucia R. Cangussu da Silva pela correção do resumo em inglês.

SUMMARY

Efficiency of *Bradyrhizobium* sp. strains on nitrogen fixation in peanut (*Arachis hypogaea* A. L.)

Thirteen strains of *Bradyrhizobium* spp. Isolated from peanut (*Arachis hypogaea* L.) crotalaria (*C. juncea*, *C. paulina* e *Crotalaria* sp) and siratro (*Macroptilium atropurpureum*) were evaluated concerning nitrogen fixation, in peanut cv. Poitara. The experiment was carried out in the greenhouse in Leonard jars filled out with sand plus nitrogen-free nutrient solution. Before planting peanut seeds were surface sterilized in sodium hypochlorite solution for 2 minutes. Each pot received 1,0 ml of a broth having a cell population of 10^8 cells/ml. Two controls without inoculation, one without and other with combined nitrogen were maintained. The combined nitrogen was added weekly as 0,18M $\text{NH}_4 \text{NO}_3$ solution so that each control plant received 275mg of this nutrient. The experiment has complete randomized statistical design with 5 replications. Plants were harvested at 60 days after planting. Shoots and roots were separated and washed. Shoots were oven dried at 65°C to constant weight. From root, nodules were excised, washed, oven dried at 65°C , counted and weighed. Samples of shoot tissue were digested using the Kjeldahl method and analyzed for total N. The efficiency of nitrogen fixation was evaluated by shoot dry weight, nodule number and weight, total shoot nitrogen, relative efficiency and mg of fixed nitrogen/mg of nodules and compared to the SMS-400 strains which is one of the most important strain for these leguminous. The significance of differences among means of treatments was calculated by analysis of variance and Tukey test at 0,05 of probability. Among all the strains studied, four showed high potential of nitrogen fixation, two presented intermediate efficacy and three were

completely inefficient. Four strains were not capable of nodule formation in peanut, suggesting that the leguminous plant presents host specificity under controlled conditions.

Key Words: peanut; *Bradyrhizobium* sp, nitrogen fixation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bataglia, O.C.; Teixeira, J.P.F.; Furlani, P.R. & Furlani, A.M.C. Análise química de plantas. Campinas, Instituto Agrônomo, 1978. 31p. (Circular 87).
2. Burton, J.C. Host Specificity among certain plants in the "cowpea" cross-inoculation group. *Soil Sci. Soc. of American Proc.*, 16:356-358, 1952.
3. Date, R.A. Especificidad en la simbiosis *Rhizobium*/leguminosas. In: Reunion Latinoamericana sobre *Rhizobium*, VII, Cali, Colômbia 1976, pp.42-89.
4. Giardini, A.R.; Lopes, E.S. & Neptune, A.M.L. Pré-seleção de estirpes de *Rizobium* sp para amendoim. *Bragantia*, Campinas, 43:389-396, 1894.
5. Lopes, E.S.; Lovadini, L.A.C.; Miyasaka, S.; Igue, T. & Giardini, A.R. Seleção de estirpes de *Rhizobium* spp. para amendoim (*A. hypogaea*, L.) e galáxia (*G. striata* (Jacq. Urban). *Bragantia*, Campinas, 33:cv-cx, 1974, (Nota, 21).
6. Lopes, E.S.; Savy Fo., A.; Oliveira, M.L.C.; Giardini, A.R. & Pompeu, A.S. Observação da nodulação natural em cultivares de amendoim. *Bragantia*, Campinas, 35:XI-XIII, 1976.
7. Lopes, E.S.; Freitas, S.S.; Lombardi, M.L.C., Portugal, E.P. & Giardini, A.R. Coleção de bactérias fixadoras de nitrogênio para leguminosas: relação das estirpes de *Bradyrhizobium* spp para amendoim. Campinas, Instituto Agrônomo, Boletim Técnico 118, 1987, 16p.
8. Sen, D. & Weaver, R.W. A comparison of nitrogen fixing ability of peanut, cowpea and siratro plants nodulated by different strains of *Rhizobium*. *Plant and Soil*, 60:317-319, 1981.
9. Somesagaram, P. & Hoben, H.J. Methods in legume-*Rhizobium* technology. NIFTAL/MIRCEN, 1985. p.160-166.
10. Wynne, J.C.; Elkan, G.H.; Meisner, C.M.; Schneeweis, T.J. & Ligon, J. M. Greenhouse evaluation of strains of *Rhizobium* for peanuts. *Agron. Journal*, 72:645-649, 1980.
11. Wynne, J.C.; Elkan, G.H. & Schneeweis, T.J. Increasing nitrogen fixation of groundnut by strain and host selection. Proceedings of the International Workshop on groundnuts. Patancheru, A.P., India, 1980. pp. 95-109.

Recebido para publicação em 18/1/91

RESISTÊNCIA TÉRMICA DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* EM LEITE DE SOJA COM E SEM O ACRÉSCIMO DE INGREDIENTES

Irene Alexeevna Machoshvili*
Thereza Christina Vessoni Penna*
& Angelo José Colombo*

RESUMO

Cepa termorresistente de *Staphylococcus aureus* foi submetida a tratamentos térmicos, utilizando-se o método do frasco, na faixa de temperaturas de 60°C a 66°C, em leite de soja puro e em leite de soja acrescido de chocolate, açúcar, levedura e carbonato de cálcio. Determinaram-se os tempos de redução decimal (valores D) e as resistências relativas (valores z). Para leite de soja puro e acrescido de ingredientes, os valores D a 60°C foram, respectivamente, 307 e 792 segundos, enquanto que os valores z foram 7,42°C e 7,51°C. Os valores D da cepa de *S. aureus* em leite de soja acrescido de ingredientes foram, em média, o dobro daqueles obtidos em leite de soja puro. O acréscimo de ingredientes proporcionou efeito protetor contra a lesão térmica de *S. aureus*, conferindo maior termorresistência.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, termorresistência, leite de soja.

INTRODUÇÃO

Mais de 50% da população humana é portadora de *S. aureus*, microrganismo largamente distribuído na natureza e freqüentemente responsável por surtos de intoxicação alimentar. Sua presença em alimentos cozidos e processados é considerada indício de higiene inadequada do manipulador, na maior parte dos casos portador assintomático, que transmite as cepas através da tosse, espirro e expectoração, contaminando mãos, utensílios e equipamento (Montes, 1977; Frazier & Westhoff, 1978; Iaria, 1978; ICMSF, 1978; Bergdoll, 1979; Iaria e cols., 1980; Banwart, 1983).

Ao atingir os alimentos, se as circunstâncias ambientais (temperatura, valor de pH, etc.) forem favoráveis, os estafilococos se multiplicam, até alcançar níveis de 10^5 células viáveis por grama, quando terá início a formação de enterotoxinas, o agente causal das gastroenterites no homem. A

manipulação dos alimentos em operações de serviços alimentícios a nível de restaurantes comerciais parece ser a maior causa dos surtos, seguida da manipulação caseira (Banwart, 1983; Smith e cols., 1983b; Vessoni Penna, 1989). As enterotoxinas estafilocócicas não são inativadas pelo cozimento normal, pasteurização ou outros tratamentos térmicos usuais, permanecendo ativas mesmo após o aquecimento a 100°C durante 30 minutos (Bergdoll, 1979).

A forma mais eficiente de se evitar as intoxicações alimentares por estafilococos é a prevenção higiênica e a aplicação de tratamentos térmicos eficientes que inativem o microrganismo. Um tratamento térmico rigoroso, entretanto, pode alterar as propriedades organolépticas e nutricionais dos alimentos, tornando o estudo dos parâmetros de resistência dos microrganismos ao calor de grande interesse prático (Lund, 1977; Bergdoll, 1979; Mossel & Moreno Garcia, 1982).

* Dept° de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP - Caixa Postal 66355 - 05389 São Paulo, SP, Brasil

A termorresistência bacteriana é influenciada por uma série de fatores, dentre os quais destacam-se as diferenças específicas entre células vegetativas e esporos, estado fisiológico das células, condições físicas e químicas de cultivo, meio de aquecimento, atividade de água e outros. Basicamente, a destruição dos microrganismos pelo calor é devida à alteração dos lipídeos celulares, à desnaturação protéica e especialmente à inativação dos sistemas enzimáticos, necessários ao metabolismo celular (Frazier & Westhoff, 1978; Olson & Nottingham, 1980; Mossel & Moreno Garcia, 1982). Várias são as metodologias existentes para a determinação da resistência microbiana ao calor, dentre as quais o método do frasco, que mostrou ser conveniente na determinação da resistência térmica de células vegetativas a temperaturas inferiores a 100°C (Stumbo, 1973).

A resistência térmica de *S. aureus* foi estudada por diversos autores, sob várias condições, porém não há dados precisos sobre sua sobrevivência no extrato hidrossolúvel de grãos de soja. Os resultados disponíveis apresentam grandes variações, dependendo das cepas e das condições de tratamento. A interferência dos constituintes de um alimento na resistência térmica de *S. aureus* é de fundamental importância. Certos alimentos contendo determinados solutos, devem receber tratamento térmico especial, com a finalidade de eliminar células vegetativas, que, quando apenas injuriadas, podem se recuperar, multiplicar-se e produzir toxinas (Smith e cols., 1982).

Devido à habilidade de crescimento e produção de toxinas, em grande variedade de alimentos, em diversas condições de armazenamento, por apresentarem termorresistência no leite, maior que aquela observada para cepas de *Salmonella enteritidis* sorotipo *senftenberg* e por outros microrganismos patogênicos de importância na pasteurização do leite de vaca, *S. aureus* merece destaque especial no contexto sócio-econômico e na escolha do par temperatura de pasteurização (Stumbo, 1973).

O presente trabalho teve como objetivo o estudo comparativo da resistência térmica de cepa de *S. aureus* em leite de soja puro e em leite de soja acrescido de ingredientes, para posterior aplicação dos resultados em escala semi-industrial.

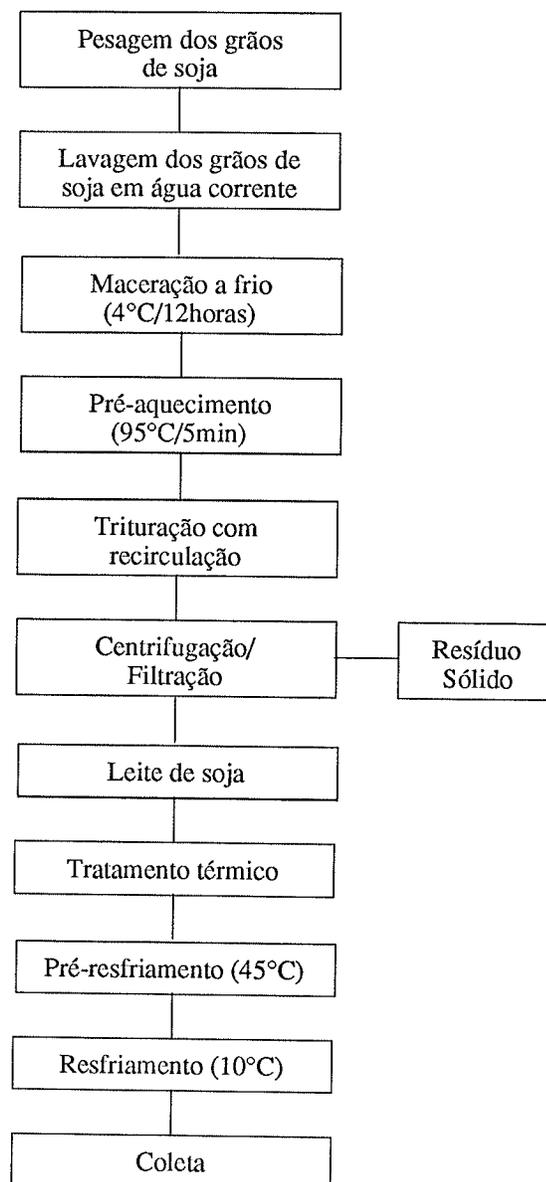
MATERIAL E MÉTODOS

Leite de soja

O leite de soja foi obtido através de processo

mecânico de extração dos componentes hidrossolúveis dos grãos de soja, na proporção de 2 kg para 16 litros de água conforme fluxograma em anexo. O líquido foi distribuído em alíquotas de 500 ml e autoclavado a 121°C durante 15 minutos.

Fluxograma do processamento do leite de soja.



Leite de soja com ingredientes

O leite de soja com ingredientes é caracterizado pelo leite de soja puro, acrescido das seguintes substâncias:

Levedura de cerveja em pó.....	1,5%
Carbonato de cálcio.....	1,0%
Chocolate em pó	5,0%
Açúcar	8,0%

Os ingredientes foram acrescentados ao leite de soja em condições assépticas e homogeneizados por agitação magnética durante 30 minutos, em banho de gelo, imediatamente antes do uso.

Microrganismo

A cepa de *S. aureus* utilizada no presente estudo foi isolada de amostra de leite de vaca pasteurizado, com teor de gordura 3,2% m/v. A cepa revelou ser produtora das enzimas catalase e coagulase e de enterotoxina E, apresentando sensibilidade aos tipos de fago do grupo II: 3A e 3C de origem humana e 116 de origem bovina (Vessoni Penna, 1985). O inóculo utilizado nos tratamentos térmicos foi obtido por suspensão da cultura de 48 horas, desenvolvida na superfície inclinada de 7 ml de Ágar para Métodos Padronizados (BIOBRÁS), em 2 ml de leite de soja. Foram utilizadas culturas de 20 tubos de ensaio, para se obter um volume total de 40 ml de suspensão, com população inicial média de 10^7 Unidades Formadoras de Colônias por mililitro. A suspensão foi homogeneizada por agitação magnética a 1060 rpm, durante 60 minutos, à temperatura de $(4 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Tratamento térmico da cepa de *S. aureus*

Os parâmetros de resistência térmica da cepa de *S. aureus* veiculada no leite de soja foram determinados, utilizando-se o método do frasco de 3 bocas (Stumbo, 1973).

Alíquota de 500 ml de leite de soja foi transferida assepticamente para um balão de 3 bocas estéril, de 1000 ml de capacidade, provido de 100 g de pérolas de vidro. A extremidade de um termopar foi introduzida em uma das aberturas do frasco, para o registro da temperatura no interior do líquido. A abertura central foi utilizada para a introdução da haste do agitador mecânico, e a terceira abertura foi reservada para inoculação da suspensão de células de *S. aureus* e retirada das amostras. O conjunto foi mergulhado em banho

de água termostaticamente controlado à temperatura de tratamento e o conteúdo permaneceu sob agitação constante até atingir equilíbrio térmico com a água do banho. Para caracterizar o teste de esterilidade, foi retirada uma alíquota de 5 ml do meio de aquecimento e imediatamente resfriada em banho de água e gelo. Mantendo o meio sob agitação constante, inoculou-se 5 ml da suspensão de células de *S. aureus*, e o cronômetro foi acionado. A intervalos de tempo regulares, 5 ml do meio de aquecimento foram retirados e imediatamente transferidos para tubos de ensaio estéreis, previamente resfriados, e levados ao banho de água e gelo, sendo agitados manualmente durante 20 segundos. As temperaturas de tratamento foram de 60°C , 61°C , 62°C , 63°C , 64°C , 65°C e 66°C , e os tempos de tratamento variaram de zero a 1096 segundos.

A viabilidade das células de *S. aureus* sobreviventes aos tratamentos térmicos foi determinada pelo método padrão de contagem em placas, por semeadura em profundidade (Ágar para Métodos Padronizados- BIOBRÁS). As placas foram incubadas à temperatura de $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ durante (48 ± 2) horas. Nas placas que apresentaram de 10 a 300 colônias, as Unidades Formadoras de Colônias foram contadas. Os números de sobreviventes, em função dos tempos de tratamento, forneceram os tempos de redução decimal (valores D) da cepa de *S. aureus*, para cada temperatura de tratamento, calculados pelo método da regressão linear, através dos mínimos quadrados.

Os parâmetros de resistência térmica da cepa de *S. aureus* em leite de soja acrescido de ingredientes foram determinados utilizando-se o mesmo procedimento descrito acima, substituindo-se o leite de soja pelo leite de soja com ingredientes.

RESULTADOS

As Figuras 1 e 2 representam graficamente os dados com os quais foram calculados os valores da Tabela 1, para o leite de soja puro e para o acrescido de ingredientes, respectivamente, às temperaturas de 60°C , 61°C , 62°C , 63°C , 64°C , 65°C e 66°C .

A Tabela 1 apresenta os tempos de redução decimal (valores D) da cepa de *S. aureus*, às temperaturas de 60°C , 61°C , 62°C , 63°C , 64°C , 65°C e 66°C , veiculada em leite de soja puro e em leite de soja acrescido de ingredientes.

Na Figura 3 estão representados graficamente os valores da resistência relativa do microrganismo (valores z), calculados a partir dos logaritmos

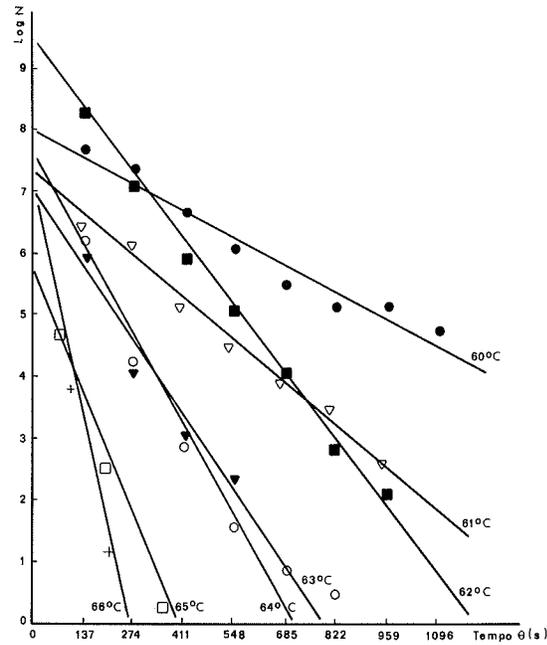


FIGURA 1 – Curva de sobreviventes e parâmetros de resistência térmica da cepa de *S. aureus* em leite de soja puro, às temperaturas de 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C e 66°C.

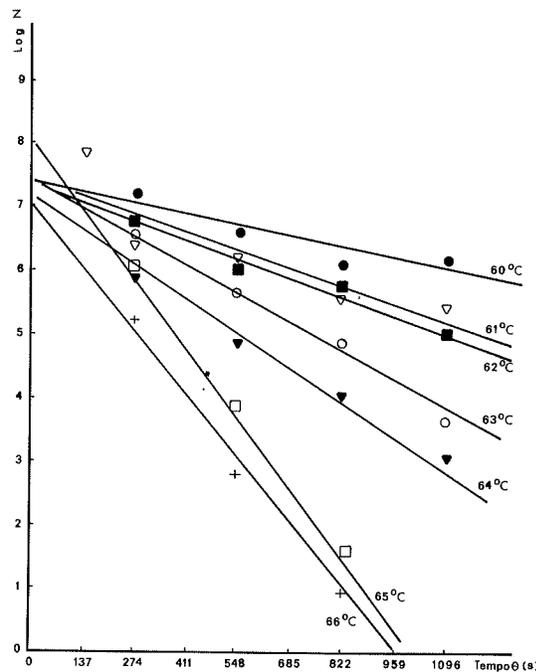


FIGURA 2 – Curva de sobreviventes e parâmetros de resistência térmica da cepa de *S. aureus* em leite de soja com ingredientes, às temperaturas de 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C, e 66°C.

TABELA 1 – Tempos de Redução Decimal (D) da cepa de *S. aureus* às temperaturas 60°C, 61°C, 62°C, 63°C, 64°C, 65°C e 66°C, em leite de soja puro e no acrescido de ingredientes.

Temperatura (°C)	Valores D (s)	
	Leite de soja puro	Leite de soja com ingredientes
60	307	792
61	198	483
62	126	454
63	113	300
64	94	253
65	70	125
66	37	135

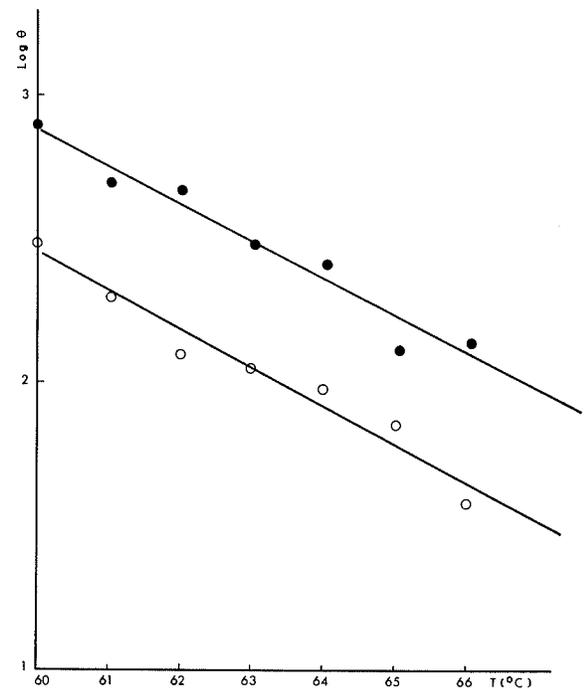


FIGURA 3 – Curvas de resistência relativa (z) da cepa de *S. aureus*, em leite de soja puro (o) e em leite de soja com ingredientes (*).

dos tempos de redução decimal em função das temperaturas de tratamento, utilizando-se o método da regressão linear, através dos mínimos quadrados. Os valores z para o leite de soja puro e para o acrescido de ingredientes foram, respectivamente, 7,42°C e 7,51°C.

DISCUSSÃO

A destruição térmica da cepa de *S. aureus* nos dois meios de aquecimento demonstrou obedecer cinética de reação de 1ª ordem, apresentando-se claramente exponencial, em ambos os casos, sendo os coeficientes de correlação superiores a 0,90 (Figuras 1 e 2).

A determinação dos parâmetros de termorresistência de forma precisa depende do aquecimento instantâneo das células, assim como de sua distribuição homogênea e individualizada. A utilização do método do frasco proporcionou aquecimento instantâneo das células inoculadas no meio teste. Embora a espécie *S. aureus* apresente tendência de formar aglomerados celulares, a sua ocorrência é rara em meios sólidos. O cultivo de *S. aureus* em meios líquidos, ricos em nutrientes, induz à formação de grumos, que se não forem desfeitos, podem levar à formação de um patamar inicial na curva de sobreviventes (Vessoni Penna, 1985). No presente trabalho, a utilização de suspensões provenientes de culturas de *S. aureus* em meios sólidos, devidamente submetidas à agitação magnética, proporcionou elevada precisão nos traçados das curvas de sobreviventes.

A temperatura e o tempo de incubação utilizados para o cultivo da cepa de *S. aureus* tiveram como finalidade a obtenção de número elevado de células, em fase estacionária de desenvolvimento, quando a termorresistência bacteriana é mais elevada.

A comparação dos resultados da Tabela 1 indica aumento considerável nos tempos de redução decimal da cepa de *S. aureus* submetida a tratamento térmico em leite de soja com ingredientes, sugerindo um efeito protetor contra os danos letais do calor, exercido pelos ingredientes acrescentados. Os tempos de redução decimal observados no tratamento térmico do leite de soja com ingredientes foram maiores que o dobro dos valores D obtidos para o leite de soja puro.

Em solução tampão fosfato pH 7,0 a cepa de *S. aureus* apresentou valores $D_{60^\circ\text{C}}$ de 246 segundos e $D_{65^\circ\text{C}}$ de 24 segundos e valor z de $5,00^\circ\text{C}$ (Machoshvili, 1990). Stiles (1965) estudou a termorresistência de cepa 196 E de *S. aureus* em leite desengordurado, com valor de pH 6,5 e obteve z igual a $7,2^\circ\text{C}$ e $D_{62^\circ\text{C}}$ de 203,21 segundos; em solução tampão com valores de pH 4,5, 5,5, 6,5 e 7,5 para os quais foram obtidos os valores z de $10,11^\circ\text{C}$, $9,61^\circ\text{C}$, $9,11^\circ\text{C}$ e $8,24^\circ\text{C}$, respectivamente, os tempos de redução decimal correspondentes foram de 37,57 segundos, 51,33 segundos, 89,23 segundos e 39,01 segundos à temperatura de 62°C .

O acréscimo de solutos ao meio de aquecimento interfere de maneira diversa na resistência térmica dos microrganismos. Em pesquisas realizadas por Calhoun & Frazier (1966), observou-se que o ajuste do meio de aquecimento à atividade de água 0,950, através da adição de cloreto de sódio, proporcionou elevada proteção à cepa 196 E de *S. aureus* contra a destruição térmica. Por outro lado, o uso da glicose para o ajuste do meio de aquecimento à mesma atividade de água, acelerou a destruição térmica da cepa testada.

Ng (1982) sugeriu que o cloreto de sódio induz a plasmólise da célula bacteriana e a consequente desidratação reduz a atividade de água interna, levando à estabilização das macromoléculas contra os efeitos subletais do calor.

Sais e açúcares têm sido utilizados na estabilização das proteínas na sua conformação nativa, e no caso de microrganismos, um sítio potencial de estabilização para os solutos protetores é a membrana celular (Arakawa & Timasheff, 1982).

A célula de *S. aureus* injuriada pelo calor perde alguns componentes citoplasmáticos, em consequência de danos na sua membrana. Estes componentes são representados pelos lipídeos, fosfolipídeos, aminoácidos, sais de sódio, potássio e magnésio e outros componentes não identificados que são absorvidos nos comprimentos de onda de 260 a 280 nm. A adição de 5% de cloreto de sódio ou de 34% de sacarose ao meio de aquecimento, protege a célula contra a perda destes componentes (Smith e cols., 1982).

Considerando que as membranas das bactérias Gram-positivas consistem de proteínas e lipídeos na proporção de 4:1 (Haard, 1972), os açúcares e os glicóis agem como protetores das proteínas da membrana, contra a desnaturação térmica, impedindo assim a perda de macromoléculas intracelulares essenciais (Smith e cols., 1983a).

Os valores z da cepa de *S. aureus* nos dois meios de aquecimento apresentaram-se próximos, indicando resistências relativas semelhantes, apesar da variação na constituição do meio (Figura 3).

Os valores D e z obtidos para o leite de soja puro e para o acréscimo de ingredientes, constituem a base dos cálculos de processamento térmico utilizado na pasteurização dos dois meios, durante produção em mini-usina de produtos hidrossolúveis.

Concluindo podemos afirmar que: - Os ingredientes (levedura, chocolate, açúcar e carbonato de cálcio), acrescentados ao leite de soja puro, exerceram efeito protetor na cepa de *S. aureus*, frente aos danos letais do calor;

- Os valores dos tempos de redução decimal da cepa de *S. aureus* em leite de soja acrescido de ingredientes foram, em média, o dobro dos valores obtidos em leite de soja puro;

- A resistência relativa (z) da cepa de *S. aureus* nos dois meios de aquecimento não apresentou diferença significativa.

AGRADECIMENTOS

- À Técnica Especializada Eva Ramos Geraldo de Sousa, pelo auxílio em laboratório.

- À Técnica Administrativa Angela Maria Lima, pela impecável datilografia.

SUMMARY

Heat resistance parameters of *Staphylococcus aureus* in soybean milk and soybean milk with additives.

Heat resistance parameters have been determined for an enterotoxin E productive strain of *Staphylococcus aureus* in soybean milk and soybean milk added with calcium carbonate, yeast, chocolate and sugar, by determining the D and z values, using the flask method. The mean D values were obtained from the survivor curves and the mean z values, from the thermal death time curves. For the range between 60°C and 66°C, the culture studied showed mean D_{60°C} values of 307 seconds and 792; mean z values of 7,42°C and 7,51°C, respectively in soybean milk and in added soybean milk with ingredients. The addition of those ones to the soybean milk exhibited protective effect on the strain studied against thermal destruction, doubling the decimal reduction times.

Key words: *Staphylococcus aureus*, heat resistance, soybean milk.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arakawa, T. & Timasheff, S.N. Stabilization of protein structure by sugar. *Biochemistry*, **21**: 6536-44, 1982.
2. Banwart, G.J. *Basic Food Microbiology*, 3ª ed., AVI Publ. Company, Connecticut, 1983, pp. 225-50.
3. Bergdoll, M.S. Staphylococcal intoxications, in: *Food-Borne infections and intoxications*, 2ª ed., (H. Riemann & F.L. Bryan, eds.), Academic Press, New York, 1979, pp. 449-94.
4. Calhoun, C.L. & Frazier, W.C. Effect of available water on thermal resistance of three nonsporeforming species of bacteria. *Appl. Microbiol.*, **14**: 416-20, 1966.
5. Frazier, W.C. & Westhoff, D.C. *Microbiologia de los alimentos*. 3ª ed., Editorial Acribia, Zaragoza, 1978, 522p.
6. Haard, N.F. Membrane structure and cellular death in biological tissue. *J. Food Sci.*, **37**: 504-12, 1972.
7. Iaria, S.T. *Staphylococcus aureus em doces vendidos em padarias e confeitarias do município de São Paulo. Produção de enterotoxina estafilocócica e fagotipagem a partir das cepas isoladas (1975/1976)*. São Paulo, 1978 [Tese Livre-Docência - Instituto de Ciências Biomédicas da USP].
8. Iaria, S.T.; Furlanetto, S.P.M.; Cerqueira-Campos, M.L. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos. *Rev. Saúde Publ.*, **14**: 93-100, 1980.
9. International Commission on Microbiological Specifications for Foods *Microorganisms in foods*. 1. Their significance and methods of enumeration. 2ª ed., Toronto, University of Toronto Press, 1978, 434p.
10. Lund, D.B. Design of thermal processes for maximizing nutrient retention. *Food Technol.*, **31**: 71-8, 1977.
11. Machoshvili, I.A. *Resistência térmica de cepas de Staphylococcus aureus em solução tampão fosfato e em leite de soja*. São Paulo, Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, 1990, 134 p.
12. Montes, A.L. *Microbiologia de los Alimentos*. Vol. 2. Ed. Resenha Universitária, São Paulo, 1977, p. 141.
13. Mossel, D.A.A. & Moreno Garcia, B. *Microbiologia de los Alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos*. Editorial Acribia, Zaragoza, 1982, 375p.
14. Ng, H. Development of high heat resistance in Arizona neotype by preincubation at 35°C in media containing NaCl. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 1294-99, 1982.
15. Olson, J.R. & Nottingham, P.M. Temperatura, in: *Ecología microbiana de los alimentos*, Vol. 1, Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. (ICMSF ed.), Editorial Acribia, Zaragoza, 1980, pp. 1-38.
16. Smith, J.L.; Benedict, R.C.; Palumbo, S.A. Protection against heat-injury in *Staphylococcus aureus* by solutes. *J. Food Protection*, **45**: 54-8, 1982.
17. Smith, J.L.; Benedict, R.C.; Haas, M.; Palumbo, S.A. Heat injury in *S. aureus* 196 E: protection by metabolizable and non-metabolizable sugars and polyols. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**: 1417-19, 1983a.
18. Smith, J.L.; Buchanan, R.L.; Palumbo, S.A. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis. A review. *J. Food Protection*, **46**: 545-55, 1983b.
19. Stiles, M.E. & Witter, L.D. Thermal inactivation, heat injury, and recovery of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Sci.*, **48**: 677-81, 1965.
20. Stumbo, C.R. *Thermobacteriology in food processing*. 2ª ed., New York, Academic Press, 1973, 236p.
21. Vessoni Penna, T.C. *Parâmetros de resistência térmica de cepas de Staphylococcus aureus no leite*. São Paulo, 1985. 300p [Tese de Doutorado Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].
22. Vessoni Penna, T. C.; Abe, L.E.; Machoshvili, I.A.; Colombo, A.J.; Baruffaldi, R. - Controle de qualidade no processo de alimentos em restaurante industrial. *Bol. Cent. Pesq. Proc. Alim.*, Curitiba, **7**: 62-78, 1989.

Recebido para publicação em 08/01/91

PRESERVAÇÃO DE MICRORGANISMOS: REVISÃO

Carmem Paiva Costa*
Maria Candida Ferreira*

RESUMO

Neste trabalho são abordados os principais métodos de preservação, como: sub-cultura, secagem ou desidratação, congelamento e liofilização.

Palavras-chave: preservação, microrganismos

A preocupação com a manutenção de culturas viáveis iniciou-se simultaneamente à descoberta dos meios artificiais de cultivo, pois a disponibilidade de microrganismos sempre foi considerada essencial ao desenvolvimento da Microbiologia, quer no setor industrial, acadêmico ou científico-tecnológico (30). O reconhecimento dessa necessidade e o desenvolvimento das técnicas de conservação deram origem à formação de Coleções de Culturas (52), hoje existentes por todo o mundo (56), oferecendo um número diversificado de serviços (33, 35, 39).

Os métodos de preservação têm como objetivo manter completa *viabilidade* e *estabilidade* dos organismos. Para obter este estado, livre de variações morfo-fisiológicas, por longo tempo, é necessário a paralização ou retardamento do metabolismo celular (29). Para tal, inúmeros processos físicos são utilizados e, na realidade, constituem-se nos métodos de conservação, ou seja, a sub-cultura ou repique sucessivo ou transferência seriada; a secagem ou desidratação; o congelamento e a liofilização.

A seleção desses métodos tem como finalidade maximizar os seus resultados, isto é, produzir maior índice de sobrevivência e estabilidade dos microrganismos, sempre considerando-se que todas essas técnicas apresentam características que devem ser associadas aos espécimes, uma vez que os microrganismos diferem na tolerância frente aos vários processos de conservação (30).

Sub-cultura

O método consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado, na incubação para obtenção de crescimento e na estocagem sob determinadas condições, com repetição deste processo para meio "fresco" em intervalos de tempos (40).

O intervalo de tempo entre as sub-culturas variará com o microrganismo e três parâmetros devem ser levados em consideração (65). Primeiro deve-se dar preferência ao meio mínimo, porque proporciona baixo metabolismo e, assim, prolonga o intervalo entre as transferências (26). Deve-se também evitar excesso de carboidratos que possam ser metabolizados, produzindo ácidos que poderiam inviabilizar a cultura. Alguns microrganismos, entretanto, requerem meios complexos de crescimento, como por exemplo os do gênero *Neisseria*, *Leptospira*, *Kloechera*, *Hanseniastpora*; sendo exigida uma maior frequência nas transferências como resultado do crescimento acelerado e acúmulo de produtos indesejáveis (40). Segundo, pode-se utilizar temperatura ambiente na incubação, porém é necessário a monitorização e cuidados para evitar a desidratação. É possível também armazenar em refrigerador (5 à 8°C), o que confere redução do metabolismo, e aumenta o intervalo entre os repiques (40). E por último, o tempo de transferência deve ser estabelecido de acordo com

* Departamento de Microbiologia Médica do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Caixa Postal 68040 - Brasil.

as condições ótimas e tempo máximo de sobrevivência para as diferentes cepas microbianas (5).

É um método vantajoso pelo baixo custo, pelo uso de técnicas simples, por não requerer reativação, pela ausência de estresse celular e por não exigir equipamentos sofisticados. Entretanto, é desvantajoso devido às possíveis trocas, a um maior risco de contaminação, a perdas de características genéticas, a requisição de maior espaço físico, por ser inconveniente para postagem e trabalhoso, se o microrganismo necessitar repiques em curto espaço de tempo.

O método de sub-cultura pode, ainda, ser utilizado na forma de *Ágar sob óleo mineral* (cerca de 2 cm acima do ponto mais alto do ágar inclinado) durante a estocagem. Isso reduz a disponibilidade de ar, diminui o metabolismo celular e a desidratação (26). O método é utilizado principalmente para fungos.

Outra variação do método constitui-se no chamado *Blocos de ágar em água*, que utiliza o inóculo do microrganismo por superposição, em ágar apropriado, que após crescimento vigoroso deve ser cortado em blocos e alguns cubos transferidos asépticamente para tubos contendo água estéril e assim estocados. Sua aplicação está restrita a microrganismos que tenham grande aderência ao ágar, como fungos e algumas leveduras (47, 18).

Por último, *Água destilada estéril*, onde se deposita a massa celular para estocagem. Tem sido proposto, com sucesso, para bactérias fitopatogênicas (36, 47), esporos do gênero *Bacillus* (44) e vírus da hepatite e poliovírus (15).

Secagem ou desidratação

A maioria das células vivas possui 80% de água, e esta fase líquida é essencial para a atividade biológica. O metabolismo celular é francamente reduzido quando se restringe à atividade da água (40, 64, 68).

Esta técnica é recomendada para fungos e bactérias esporulantes, que são mais resistentes à dessecação (56, 61).

Várias matrizes podem ser empregadas, e dentre elas, as mais comuns são *areia, solo* ou *silica gel*. Faz-se a suspensão do microrganismo em água estéril, quando a matriz for solo ou areia e em leite desnatado gelado a 5%, quando for sílica. Inocula-se na matriz e deixa-se secar à temperatura ambiente por alguns dias. Quando secos (grânulos

soltos), veda-se o frasco firmemente e estoca-se. Para reativação, alguns grânulos são inoculados diretamente sobre o meio indicado (29). Pode-se empregar também contas de porcelana e fibra de quartzo, aplicando-se a mesma metodologia.

Tiras ou discos de papel são utilizáveis também como matrizes. Recomenda-se papel de filtro, Whatman nº 4, previamente cortado e autoclavado em papel de alumínio, onde inocula-se a suspensão microbiana, que em dessecador, por algumas semanas, a 4°C é desidratada. Após esse período, o material é selado e armazenado em recipientes secos. Para reativação, uma tira ou disco é retirado, asépticamente, e inoculado em meio adequado (5, 7).

Pode-se ainda preparar pastilhas de *amido, peptona* ou *dextrana*, onde inocula-se volume da suspensão celular. As pastilhas são secas e armazenadas sob vácuo. Preserva-se, com sucesso, bactérias que não sobrevivem satisfatoriamente à liofilização, como *Neisseria gonorrhoeae* e *Vibrio cholerae* (4).

Outro suporte utilizado é o *disco de gelatina*. Prepara-se uma suspensão microbiana em meio de gelatina nutriente, distribui-se gotas dessa suspensão, em placas de Petri estéreis, que são levadas a secar. Os discos obtidos são armazenados em recipientes contendo sílica gel ou pentóxido de fósforo (66).

O método é extremamente simples, econômico, não demanda aparelhos sofisticados, facilita o trabalho de postagem de grande número de culturas e apresenta baixo risco de contaminação. Entretanto, a definição da viabilidade microbiana, nesta técnica, por longo tempo, ainda requer uma análise sistemática, sendo mais indicado para grupos particulares de microrganismos.

Congelamento

O congelamento das amostras microbianas e estocagem a baixas temperaturas permitem um bloqueio seguro no metabolismo celular (26). Porém, o congelamento e descongelamento acarretam danos celulares, que se manifestam por vários níveis de alterações (46, 51, 53). Esta crio-injúria pode ser resultante de choque térmico (9, 62); do efeito na concentração do soluto intra e extra-celular (34, 17); da desidratação (57); da formação de gelo interno (23, 51); da recristalização do gelo interno (23) e formação de um volume mínimo da célula (43, 54).

O congelamento pode ser praticado em freezer ($\Delta t^* = 1^\circ\text{C}$), com gelo seco ($\Delta t = 7^\circ\text{C}$) e em Nitrogênio líquido ($\Delta t = 200^\circ\text{C}$) e a estocagem pode variar de -20 a -196°C .

* Δt = Valor de abaixamento de temperatura/minuto

A estocagem a -70°C tem sido utilizada com sucesso para diferentes microrganismos (48), como bactérias (24), micoplasmas, fungos, protozoários, bacteriófagos. Entretanto a estocagem a temperaturas acima de -30°C deve ser empregada com cautela, pois favorecem a formação de mistura eutética, expondo a célula a altas concentrações de sais.

A crio-preservação, em Nitrogênio líquido (-196°C) ou Nitrogênio em fase de vapor (-150°C) é universalmente aplicado aos fungos (34), bacteriófagos (21), vírus (31), algas (45), protozoários (45), leveduras (72), células de mamíferos (45), células vegetais (11), bactérias, inclusive as fastidiosas (22, 28, 60). Temperaturas ultra baixas induzem à formação de frente de cristalização, que rapidamente atravessa a zona de eutexia, evitando assim a desidratação (51).

Para proteção dos microrganismos utilizam-se agentes crio-protetores, como o glicerol a 10%, o dimetilsulfóxido (DMSO) a 5%; leite desnatado a 10%, inositol e sacarose (3, 19, 51, 55).

Deve-se respeitar, também, fatores como a velocidade de descongelamento, condições de crescimento, idade do cultivo, etc. (10, 27, 58).

É um método rápido, fácil, não demanda manipulação durante a estocagem e não requer grande espaço. A estocagem quando feita em Nitrogênio líquido permite manter por longo tempo a viabilidade e é útil para microrganismos mais fastidiosos. No entanto, o seu custo é elevado, além de exigir cuidados com o suprimento de Nitrogênio, sendo limitado quanto à distribuição. O Nitrogênio líquido exige suprimento contínuo e apresenta riscos de explosão.

Liofilização

Consiste na remoção do vapor d'água diretamente de amostras congeladas e continuada secagem sob vácuo, até produção de material estável (70). É considerado um dos mais efetivos métodos de preservação para a maioria dos microrganismos (1, 6, 12, 41, 59, 67), sendo, entretanto, menos aplicável para algas e inadequado para protozoários (52).

Dentre as várias manifestações do dano celular, causado por esse processo, incluem-se as alterações na permeabilidade da membrana celular, o aumento da sensibilidade para alguns agentes seletivos, o aumento da fase lag de crescimento e a necessidade de incremento nutricional (32).

Seu processamento é aparentemente simples, porém são muitos os fatores que interferem na técnica em si (14).

Para preparar a suspensão microbiana, deve-se utilizar culturas no final da fase logarítmica e no início da estacionária, que correspondem ao máximo de crescimento e estabilidade (8, 9). Muito embora alguns microrganismos, como o *Rhizobium melilot*, apresentem melhor sobrevivência quando liofilizados na fase logarítmica (2).

Deve ser levado em consideração o incremento no congelamento, uma vez que, realizado lentamente leva à formação de poucos cristais de gelo com grandes dimensões, enquanto o congelamento rápido forma inúmeros cristais de pequenos tamanhos. Não se pode esquecer, entretanto, que ocorre maior desidratação quando o decréscimo da temperatura é feito lentamente (23, 54).

É importante que haja uma alta concentração celular viável na ampola antes da liofilização, pois uma relativa perda de viabilidade pode ocorrer no processo, apesar destes mesmos microrganismos servirem de proteção aos que permanecerem viáveis (16, 42).

Além dos agentes crio-protetores citados no método de congelamento, muitos outros são indicados com sucesso, como o etileno glicol, o mel, o sangue, rafinose, etc. (14, 38, 49, 50).

A umidade residual também deve ser levada em consideração. Tanto a insuficiente secagem, como o excesso de absorção da umidade, causa rápido decréscimo da viabilidade. Este conteúdo ótimo variará com a composição da suspensão celular, com a atmosfera de estocagem, com a espécie e com o estado fisiológico do microrganismo (13, 73, 74).

A atmosfera de exposição do liofílico também influencia na viabilidade da amostra estocada por este método. As ampolas devem ser seladas sob vácuo, para evitar a ação deletéria do oxigênio molecular e a influência negativa de radicais livres (37, 72, 73).

Deve-se dar preferência a estocagem a baixas temperaturas e sempre na ausência de luz, para se evitar a quebra da estabilidade do liofílico (20).

Por último, o teor nutricional, a osmolaridade e a temperatura do fluido de reconstituição são decisivos na recuperação da injúria celular (20, 69, 71).

A liofilização apresenta a vantagem de permitir a estocagem por longo tempo, possui menor risco de contaminação e não requerer manipulação adicional. Por outro lado, demanda um alto custo e possui pontos críticos já enunciados anteriormente.

Uma variação deste método, denominada "L-drying", consiste na secagem sem congelamento, e é utilizado, para microrganismos que não resistem à sublimação (25, 40, 63).

Assim, conhecendo-se os diferentes métodos de

preservação, seus fundamentos e implicações, deve-se avaliar os resultados de cada processo em relação aos diferentes microrganismos e sua viabilidade econômica, a fim de optarmos por técnicas que nos proporcionem êxito prolongado nas conservações.

SUMMARY

Preservation of microorganisms: a review.

The development of conservation methods driven the establishment of all culture collections, since organisms, maintaining viable and stable are important instruments to academic and industrial area. Many physical process can be done for that conservation and the selection of them has the aim to produce better rates of surviving and stability.

Among them, the sub-culture is composed by inoculation, incubation and storage, with repetition of this process at time intervals. It is one advantageous methodology by small costs and simple technology. On the other hands, it is possible, during manipulation, changes and contaminations and it is inconvenient for mailing.

The dehydration is recommended to microorganisms as fungi, spore forming bacteria. The microbial suspension is allowed to settle down over various matrices, such as silica, soil, paper, etc. After dehydration they are stored in bottles containing desiccants as silica gel or phosphorus pentoxide.

This is a simple and economic method and it can be used in distribution by mailing, in spite of being not known the viability that method offers.

The freezing allows the blockage of cellular metabolism. However, as the cellular damage occurs with frequency, cryoprotectants agents must be used such as glycerol, dimethyl sulphoxide, skim milk, sucrose, etc. This freezing can be done in freeze, dry ice and also in liquid nitrogen. It is rapid, easy and it does not demand manipulations, although it is expensive and impossible to distribute.

The lyophilization associates the dehydration to the freeze act. It is considered one of the most effective method of preservation for the majority of microorganisms, with exception for algae and protozoa. Many parameters must be considered to the success of the methodology bacterial suspension, the cooling velocities, cryoprotectants, humidity, recovery medium, etc. It is an advantageous method because permits long term storage and by small risk of contamination. However it is an expensive method.

Since many preservation methods are available

the choose must be criterious to the success on the conservation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, G.A. - Improved Lyophilization procedure for storage of reference cultures and clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.*, **13**: 805-806, 1981.
- Amarger, N.; Jacquemetton, M. & Blond, G. - Influence de L'Age de la culture sur la survie de *Rhizobium melilot* à la lyophilisation et à la conservation après lyophilisation. *Arch. Mikrobiol.*, **81**: 361-366, 1972.
- Anchordoguy, T.Y.; Rudolph, A.S.; Carpenter, J.F. & Crowe, J.H. - Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiology*, **24**: 324-331, 1987.
- Annear, D.I. - The preservation of bacteria by drying in peptone plugs. *J. Hyg. (Camb.)*, **54**: 487-508.
- Antheunisse, J. - Preservation of microorganisms. *Antonie V. Leeuwenhoek*, **38**: 617-622, 1972.
- Antheunisse, J. - Viability of lyophilized microorganisms after storage. *Antonie V. Leeuwenhoek*, **39**: 243-248, 1973.
- Antheunisse, H.; Bruin-tol, J.W.; Wan Der Pol-van Soest, M.E. - Survival of microorganisms after drying and storage. *Antonie V. Leeuwenhoek*, **47**: 539-545, 1981.
- Ashwood-Smith, M.J. - On the genetic stability of bacteria to freezing and thawing. *Cryobiology*, **2**: 39-43, 1965.
- Ashwood-Smith, M.J.; Trevino, J. & Warby, C. - Effect of freezing on the molecular weight of bacterial DNA. *Cryobiology*, **9**: 141-143, 1972.
- Avtushenko, S.S.; Babkin, E.I.; Aleksandrenkova, O.V.; Balmaso, V.A.; Batarin, V.I. & Yaremenko, T.G. - Storage of inoculation cultures of microorganisms at low temperature. *Mikrobiologiya*, **57**: 333, 1988.
- Bajaj, Y.P.S. - Regeneration of plants from frozen (-196°C) protoplasts of *Atropa belladonna* L., *Datura innoxia* M. and *Nicotiana tabacum* L. *Ind. J. Exp. Biol.*, **26**: 289-292, 1988.
- Balen, L.; Silva, E.N.; Andreatti, R.L.; Gaviolle, M.C. & Cappelaro, C.E.M.P.D. - Conservação da amostra Conn-F de *M. gallisepticum* pelo congelamento e liofilização. *Rev. Microbiol.* **20**: 71-77, 1989.
- Bateman, J.B.; Stevens, C.L.; Mercer, W.D. & Carstensen, E.L. - Relative humidity and the killing of bacteria: The variation of cellular water content with external relative humidity or osmolality. *J. Gen. Microbiol.*, **29**: 207-219, 1962.
- Benedict, R.G.; Sharpe, E.S.; Corman, J.; Meyer, G.B.; Baer, E.F.; Hall, H.H. & Jackson, R.W. - Preservation of microorganisms by freeze-drying. *Appl. Microbiol.*, **9**: 256-262, 1961.
- Biziagos, E.; Passagot, J.; Crance, J. & Deloince, R. - Long-term survival of hepatitis A virus and Poliovirus type 1 in mineral water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**: 2705-2710, 1988.
- Bretz, H.W. & Ambrosini, R.A. - Survival of *E. coli* frozen in cell extracts. *Cryobiology*, **3**: 40-46, 1966.
- Calcott, P.H. & MacLeod, R.A. - The survival of *E. coli* from freeze-thaw damage: Permeability barrier damage and viability. *Can. J. Microbiol.*, **21**: 1724-1732, 1975.
- Capriles, C.H.; Mata, S.; Middelveen, M. - Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*,

- 106: 73-79, 1989.
19. Chavarri, F.J.; Paz, M. & Nunez, M. - Cryoprotective agents for frozen concentrated starters from non bitter. *St. lactis* strains. *Biotechnol. Letters*, 10: 11-16, 1988.
 20. Choate, R.V. & Alexander, M.T. - The effect of the rehydration temperature and rehydration temperature medium on the viability of freeze-dried *Spirillum atlanticum*. *Cryobiology*, 3:419-422, 1967.
 21. Clark, W.A. & Klein, A. - The stability of bacteriophages in long term storage at liquid nitrogen temperatures. *Cryobiology*, 3: 68-75, 1966.
 22. Eckert, H.L. & Flahert, D. - Long-term preservation of *B. pertussis*, *Appl. Microbiol.*, 23: 186-187, 1972.
 23. Farrant, J.; Walter, C.A.; Lee, H. & McGann, L.E. - Use of two-step cooling procedures to examine factors influencing cell survival following and thawing. *Cryobiology*, 14: 273-286, 1977.
 24. Feltham, R.K.A.; Power, A.K.; Pell, P.A. & Sneath, P.H.A. - A simple method for storage of bacteria at -76°C. *J. Appl. Bacteriol.*, 44:313-316, 1978.
 25. Fry, R.M. & Greaves, R.I.N. - The survival of bacteria during and after drying. *J. Hyg. (Camb.)*, 49: 220, 1954.
 26. Guerna, R.L. - Preservation, In: Gerhardt, P., ed., *Manual of Methods for General Bacteriology*. ASM, Washington, D.C., 208-217, 1981.
 27. Gibson, L.F. & Khoury, J.T. - Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Letters Appl. Microbiol.*, 3:127-129, 1986.
 28. Gilmour, M.N.; Turner, G., Berman, R.G. & Krenzer, A.K. - Compact liquid nitrogen storage system yielding high recoveries of Gram-negative anaerobes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 84-88, 1978.
 29. Grivell, A.R. & Jackson, J.F. - Microbial culture preservation with silica gel. *J. Gen. Microbiol.*, 58: 423-425, 1969.
 30. Haynes, W.C.; Wickerham, L.J. Hesselstine, C.W. - Maintenance of cultures of industrially important microorganisms. *Appl. Microbiol.*, 3:361-372, 1955.
 31. Heckly, R.J. - Preservation of microorganisms. *Advan. Appl. Microbiol.*, 24: 1-53, 1978.
 32. Heckly, R.J. & Quay, J. - Brief review of lyophilization damage and repair in bacterial preparations. *Cryobiology*, 18:592-597, 1981.
 33. Hesselstine, C.W. & Pridham, T.G. - Culture collections and patent depositions. *Advan. Appl. Microbiol.*, 19: 1-23, 1975.
 34. Hubalek, Z. & Kockova-Kratochvilova, A. - Liquid nitrogen storage of yeast cultures. *Antonie V. Leeuwenhoek*, 44:299-241, 1978.
 35. Hunter, J.C.; Belt, A. & Hallvin, A.P. - Guidelines for establishing a culture collection within a biotechnology company. *Trends in Biotechnol.*, 4: 5-11, 1966.
 36. Iacobellis, N.S. & James, D.V. - Long-term storage of plant-pathogenic bacteria in sterile distilled water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 388-389, 1986.
 37. Israeli, E.; Kohn, A. & Gitelman, J. - The molecular nature of damage by oxygen to freeze-dried *E. coli*. *Cryobiology*, 12: 15-25, 1975.
 38. Jansen, D.W. & Busta, F.F. - Influence of milk components on the injury, repair of injury, and death of *Salmonella anatum* cells subjected to freezing thawing. *Appl. Microbiol.*, 26: 725-732, 1973.
 39. Kirsop, B.E. - Computerised data bases for locating microorganisms: Functions and difference of major information resources. *Mircea J.*, 4: 419-424, 1988.
 40. Kirsop, B.E. - Culture and preservation. In: *Living resources for biotechnology-yeast*. Ed. by Kirsop, B.E. & Kurtzman, C.P., Cambridge University Press. 1988.
 41. Koshelev, A.V. & Nesterov, A.I. - Accelerated test for predicting survival of lyophilized cultures of methanotrophic bacteria. *Mikrobiologiya*, 56: 492-496, 1987.
 42. Kupleshaya, M.B. - Results of storing lyophilized cultures of microorganisms for 25 years. *Mikrobiologiya*, 56: 488-491, 1987.
 43. Kurtzman, C.P. - Preservation of fungi by lyophilization and liquid nitrogen freezing. In: *The preservation of microorganisms by freezing and freeze-drying*. Annual meeting of the society for industrial microbiology, 1980.
 44. Leaper, S. & Bloor, K. - A note on the effect of storage on the chemical resistance of spores of *Bacillus subtilis* SA 22 and *Bacillus subtilis globigii* B 17. *J. Appl. Bacteriol.*, 64: 183-186, 1988.
 45. Leeson, E.A.; Cann, I.P. & Morris, G.J. - Maintenance of algae and protozoa. In: Maintenance of microorganisms. Academic Press, London, 1984.
 46. Leibo, S.P. & Mazur, P. - The role of cooling rates in low-temperature. *Cryobiology*, 8: 447-452, 1971.
 47. Leon, R.; Castellanos, M. & Rolz, C. - Storage in water of *Rhizobium phaseoli* cells harvested from continuous culture and its effect on biological nitrogen fixation. *Biotechnol. Letters*, 10: 509-512, 1988.
 48. Ludlam, H.A.; Nwachukwu, B.; Noble, W.C.; Swan, A.V. & Phillips, I. - The preservation of microorganisms in biological specimens stored at -70°C. *J. Appl. Bacteriol.*, 67: 417-423, 1989.
 49. Malik, K.A. - A new freeze-drying method for the preservation of nitrogen-fixing and other fragile bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 8: 259-271, 1988.
 50. Malik, K.A. - Long-term preservation of some *Rhodospirillaceae* by freeze-drying. *J. Microbiol. Methods*, 8: 273-280, 1988.
 51. Mazur, P. - Cryobiology: The freezing of biological systems. *Science*, 168: 939-949, 1970.
 52. Mazur, P. - The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14: 251-272, 1977.
 53. McGann, L.E.; Yang, H. & Walterson, M. - Manifestations of cell damage after freezing and thawing. *Cryobiology*, 25:178-185, 1988.
 54. Meryman, H.T. - The interpretation of freezing rates in biological materials. *Cryobiology*, 2: 163-170, 1966.
 55. Meryman, H.T.; Williams, R.J. & Douglas, M.S.J. - Freezing injury from solution effects and its prevent by natural or artificial cryoprotection. *Cryobiology*, 14: 287-302, 1977.
 56. MICIS - Microbial Culture Information Service, 1, 1985.
 57. Moreno, J.; Gonzales-Lopes, J. & Vela, G.R. - Survival of *Azotobacter* spp in dry soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, 51: 123-125, 1986.
 58. Mugnier, J. & Jung, G. - Survival of bacteria and fungi in relation to water activity and the solvent properties of water in biopolymer gels. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:108-114, 1985.
 59. Nei, T. - Low-temperature preservation of microorganisms. *Fed. Proc.*, 24: 284-285, 1965.
 60. Owen, R.J.; On, S.L. & Costas, M. - The effects of cooling rates, freeze-drying suspending fluid and culture age on the preservation of *Campylobacter pylori*. *J. Appl. Bacteriol.*, 66:331-337, 1989.
 61. Palit, A.; Haylock, L.M. & Cox, J.C. - Storage of pathogenic leptospires in liquid nitrogen. *J. Appl. Bacteriol.*, 61: 407-411, 1986.

62. Petras, S. F. & Casida, L.E. - Survival of *B. thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ Microbiol.*, 50: 1496-1501, 1985.
63. Postgate, J.R. & Hunter, J.R. - On the survival of frozen bacteria. *J.Gen. Microbiol.*, 26: 367-378, 1961.
64. Rhodes, M. & Fisher, P.J. - Viability of dried bacterial cultures. *J. Gen. Microbiol.*, 4: 450-456, 1950.
65. Sherman, P. & Drum, B. - Long-term storage of *Campylobacter pylori*. *J. Clin Microbiol.*, 27: 1655-1656, 1989.
66. Sinclair, J.L. & Alexander, M. - Role of resistance to starvation in bacterial survival in sewage and lake water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 410-415, 1984.
67. Staab, A.J. & Jan, K.E. - Viability of lyophilized anaerobes in two média. *Cryobiology*, 24: 174-178, 1987.
68. Stamp, L. - The preservation of bacteria by drying. *J. Gen. Microbiol.*, 1: 251, 1947.
69. Swartz, H.M. - Effect of oxygen freezing damage: II-physical-chemical effects. *Cryobiology*, 8: 255-264, 1971.
70. Swartz, H.M. - Effect of oxygen on freezing damage: III-Modification by B-mercapto-ethylamine. *Cryobiology*, 8: 543-549, 1971.
71. Swift, H.F. - Preservation of stock cultures of bacteria by freezing and drying. *J.Exp.Med.*, 33: 69-75, 1921.
72. Wellman, A.M. & Stewart, G.G. - Storage of brewing yeasts by liquid nitrogen refrigeration. *Appl. Microbiol.*, 26: 577-583, 1973.
73. Valdez, G.F. - Effect of the rehydration medium on the recovery of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50: 1339-1341, 1985.
74. Valdez, G.F.; Giori, G.S.; Holgado, A.P. & Oliver, G. - Effect of drying medium on residual moisture content and viability of freeze-dried lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 413-415, 1985.

Recebido para publicação em 30/04/90

**"IN VITRO" SUSCEPTIBILITY TO IMPENEM OF ACTINOBACILLUS
(HAEMOPHILUS) ACTINOMYCETEMCOMITANS STRAINS ISOLATED IN BRAZIL.**

Mario Julio Avila-Campos ¹,
Maria Auxiliadora Roque de Carvalho ¹,
Norma Lúcia Santos Raymundo ¹,
Luiz de Macêdo Farias ¹,
Carlos Américo Veiga Damasceno ¹,
Eduardo Osório Cisalpino ¹.

SHORT COMMUNICATION

SUMMARY

Imipenem is a beta-lactam antibiotic, a potent new carbapenem with broad antibacterial spectrum. The resistance level to imipenem of human and non-human oral strains of *Actinobacillus actinomycescomitans* was determined by using an agar dilution method. All the 31 tested strains showed "in vitro" susceptibilities ranging from 0.125 to 1 µg/ml. 90% of the human strains showed MICs values twofold higher than those showed by the non-human ones. This study confirms the activity of imipenem, new beta-lactam antibiotic, against penicillin-resistant microorganisms.

Key Words: *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycescomitans*, Imipenem, MIC.

Imipenem (N-formimidoyl thienamycin) is a beta-lactam antibiotic produced by fermentation for the *Streptomyces cattleya* (Kahan, J.S. & Col., *J. Antibiot.* 32:1-13, 1979). It is a member of a new class of antibiotics, the carbapenems. Imipenem shows a potent antimicrobial "in vitro" activity against a variety of Gram-positive and Gram-negative aerobic and anaerobic pathogenic microorganisms (Kroop, H. & Col., *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:993-1000, 1980), and it has been used in some countries in the therapy of infectious diseases since the beginning of the 80s. Only recently, the antimicrobial was introduced in our country and there have been published very few data on microbial susceptibility of bacteria isolated in Brazil (Godoy, C.V.F. & Col., *Rev. Inst. Med. Trop.* 31:169-176, 1989).

Actinobacillus actinomycescomitans is a Gram-negative microaerophilic or facultative bac-

terium, usually recovered in anaerobic conditions (Slots, J., *J. Clin. Microbiol.* 15:606-609, 1982; Farias, L.M. & Col., *Rev. Microbiol.* 17:296-306, 1986; Avila-Campos, M.J. & Col., *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30:301-305, 1988). It is a indigenous microorganism to the human oral cavity that has been associated with different clinical pictures of mixed oral anaerobic infections known as periodontal diseases, particularly those from children and young adults (Slots, J., Reynolds, H.S. & Genco, R.J. *Infect. Immun.* 29:1013-1020, 1980; Preus, H.R. & Olsen, I., *J. Periodontol. Res.* 23:68-71, 1988). It has also been linked to different pathological pictures, such as endocarditis and cerebral abscess (Hofstad, T. & Stallemo, A., *Scand. J. Infect. Dis.* 13:78-79, 1981), and it has been recovered from some experimental animals, including rodents and non-human primates (MacDonald, J.B., Socransky, S. & Sawyer, S., *Arch.*

1. Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Depto. de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, CP. 2486, CEP 30.161, Belo Horizonte, MG., Brazil.

Oral Biol. 1:1-7, 1959; Taichman, N.S. & Col., *J. Periodontol Res.* 19:133-145, 1984).

A. actinomycetemcomitans produces several enzymes and toxic substances, including a potent leukotoxin, besides an endotoxin cellular component (Slots, J. & Genco, R.J., *J. Den. Res.* 63:412-421, 1984). A relationship between virulent strains and the presence of lisogenic phages has been suggested (Preus, H.R., Olsen, I. & Gjermo, P., *Acta Odontol. Scand.* 45:49-54, 1987).

On the other hand, this microorganism shows resistance to penicillin (Slots, J., Rosling, B.G. & Genco, R.J., *J. Periodontol.* 45:193-196, 1983; Avila-Campos, M. J. & Col., *Rev. Lat-amer. Microbiol.*, 30:307-311, 1988), usually considered as drug of choice for oral pathologies.

This study was carried out to examine the "in vitro" susceptibility of *A. actinomycetemcomitans* strains isolated from human and *Callithrix penicillata* marmoset oral microbiota.

26 strains of *A. actinomycetemcomitans* isolated from patients with localized juvenile periodontitis aged between 15 and 30 years from periodontal clinics of Universidade Federal de Minas Gerais, and five strains of dental plaque of *Callithrix penicillata* marmoset, maintained in captivity in the animal house of ICB/UFMG, were tested in this study.

The strains were isolated by using selective tryptic soy-serum-bacitracin-vancomycin agar medium (TSBV), pH 7.2 (Slots, J., *J. Clin. Microbiol.* 15:606-609, 1982), incubated anaerobically in jars containing a gas mixture (90% N₂/10%CO₂) at 37°C for 72 h, identified as *A. actinomycetemcomitans* by their cultural and cellular morphologic characteristics and by biochemical tests (Hofstad, T. & Stallemo, A., *J. Infect. Dis.* 13:78-79, 1981; Farias, L. M. & Col., *Rev. Microbiol.* 17:296-306, 1986; Avila-Campos, M.J. & Col., *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30:301-305, 1988). The strains were maintained on brain-heart-infusion blood agar and stored in freezer at -70°C.

The resistance level to imipenem was determined by using an agar dilution method in glass Petri dishes. The culture medium used was that described by Wilkins & Chalgren (Wilkins, T.D. & Chalgren, S., *Antimicrob. Agents Chemother.* 10:926-928, 1976), at pH 7.2, prepared 2-4 h before performing the tests. Stock solutions of imipenem (Merck Sharp & Dohme Research Laboratories) were prepared in 10 mM of buffer phosphate pH 7.0, and subsequently diluted in distilled water. Stock solutions were prepared just before used, and stored in the dark, at 4°C.

Inoculum was prepared in brain-heart-infusion broth using a density of 10⁷ cell/ml (Avila-Campos, M.J. & Col., *Rev. Microbiol.* 19:56-59, 1988). The Wilkins & Chalgren plates were inoculated with a steers replicator (Steers, E., Foltz, E.L. & Graves, B.S., *Antimicrob. Chemother.* 9:307-311, 1959) which delivered a final inoculum of approximately 10⁴ cell/spot, and incubated in microaerophilic conditions (Candle jars) at 37°C for 48 h. The inoculum size was verified by plating serial dilutions of the inoculum and performing colony counts. After the incubation period, the minimal inhibitory concentration (MIC) for each tested strain was recorded as the lowest concentration of the agent that prevented macroscopic growth. Reference strain *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522 was included in the tests

Table 1 shows the "in vitro" activity of imipenem against human (26) and non-human (5) oral strains of *A. actinomycetemcomitans*. All the 31

TABLE 1 - "In vitro" activity of imipenem¹ against *A. actinomycetemcomitans* strains isolated from human and from *C. penicillata* marmoset oral cavities.

Tested Strains (N ^o)	MIC (ug/ml)		
	Range	50%	90%
Human (26)	0.125 - 1	0.5	0.5
Marmoset (5)	0.125 - 0.25	0.125	0.25

¹ Breakpoint to imipenem, 16 ug/ml.

MIC for *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29522, 0.5 ug/ml.

tested strains showed "in vitro" susceptibilities ranging from 0.125 to 1 ug/ml.

These data clearly confirm the broad antibacterial spectrum of this new drug, compared with other beta-lactam antibiotics (Kroop, H. & Col., *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:912-917, 1980).

90% of the animal strains showed MIC values twofold lower than those showed by the human strains. No resistant strain was observed.

Imipenem and meropenem, new carbapenems antibiotics, have substantial "in vitro" activity against aerobic and anaerobic common bacterial pathogens as shown by worldwide "in vitro" susceptibility studies (Kroop, H. & Col., *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:993-1000, 1980; Shungu, D.L. & Col., *J. Clin. Microbiol.* 23:421-424, 1986), including strains carrying resistance markers to beta-lactam antibiotics. It is a highly active drug against Enterobacteriaceae, the nonfermenting Gram-negative bacilli (except for *Pseudomo-*

nas maltophilia), Gram-positive cocci and coccobacilli (Kesado, T., Hashizume, T. & Asahi, Y., *Antimicrob. Agents Chemother.* 17:912-917, 1980), and species of *B. fragilis* group (Cuchural, G.J. Jr., Malamy, M.H. & Tally, F.P., *Antimicrob. Agents Chemother.* 30:645-648, 1986).

The activity of imipenem, against penicillin-resistant microorganisms could be used as an option in the therapeutic of the infectious disease produced by *A. actinomycetemcomitans*.

This information on the susceptibility profile of microorganisms that have great importance in the human and animal pathology is important for a rational therapeutic but, at the same time, the serious risk, inherent to the existence of a complex indigenous flora, must be observed. As a potent broad spectrum antibacterial agent, imipenem could drastically interfere in the equilibrium of the resident microbiota, with obvious consequences. So, despite the clinical efficacy of this singular new antimicrobial, one must be very careful in prescribing this drug, that should be used only for treating serious bacterial infections.

The selection of multiple resistant strains of Gram-negative antibiotic resistant anaerobic rods that are more frequently isolated from endogenous infections is increasing worldwide. On the other hand, the "in vivo" and "in vitro" inter and intra-bacterial species transfer of drug resistant markers in also mentioned in the literature. Unfortunately, it is most probable that imipenem will not be an exception for resistant strains have been reported (Shungu, D.L. & Col., *J. Clin. Microbiol.* 23:421-424, 1986).

Considering that there is almost a complete lack of information concerning the susceptibilities to imipenem of human or animal bacterial strains recovered from normal or pathological conditions in Brazil, other studies are necessary.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are indebted to Luzia Rosa Rezende for their technical help.

This work was supported by grants of the CPq/UFGM, CNPq, and FINEP.

RESUMO

Susceptibilidade "in vitro" ao Imipenem de cepas de *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans*, isoladas no Brasil.

O imipenem é um antibiótico beta-lactâmico, carbapenêmico novo e com amplo espectro antibacteriano. O nível de resistência de cepas orais humanas e não-humanas de *A. actinomycetemcomitans*, para o imipenem, foi determinado pelo método de diluição em ágar. Todas as 31 cepas testadas apresentaram uma faixa de susceptibilidade "in vitro" de 0.125 para 1 ug/ml. 90% das cepas humanas apresentaram valores das CIMs duas vezes maiores que aqueles apresentados pelas cepas não-humanas. Este estudo confirma a boa atividade do imipenem, novo antibiótico beta-lactâmico, contra microrganismos penicilina-resistentes.

Palavras-chave: *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans*, Imipenem, CIM.

Received for publication in 7/3/91.

MYCOLOGICAL EVALUATION OF FILTRATED JUICE OF AGAVE SISALANA PERRINE'S LEAF

Maria de Fátima Costa Pires*
Adhemar Purchio*

SHORT COMMUNICATION

SUMMARY

As verified by Salomão and Purchio in 1982, the filtrated juice of *Agave sisalana's* leaf contains a compound capable of inhibiting *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* growth and in sub-inhibitory concentrations can interfere in aflatoxin's synthesis. Following this strategy of research, the inhibitory activity in corn samples contaminated by these toxigenic fungi was investigated. Specific testing was performed with three strains per specie of *A. parasiticus*, *A. flavus* and *Aspergillus* sp, in order to demonstrate the efficiency of the process. The corn samples, sterilized by ethylene oxide, were transferred to Erlenmeyer flasks, where they were damped with juice and contaminated by the toxigenic fungi. Growth inhibition was observed and the possible use of *Agave sisalana's* filtrated juice for this purpose could be demonstrated. Toxicological evaluation, performed on laboratory animals, took place during these experiments.

Key Words: *Agave sisalana* juice, aflatoxin synthesis.

Aspergillus flavus and *Aspergillus parasiticus*, indigenous food contaminants, are aflatoxin producers. These are highly toxic substances which exhibit several pharmacological properties and also carcinogenic, mutagenic and teratogenic effects.

When these microorganisms are absent in cereals, that should not lead to the statement that the mycotoxin is also absent, specially when preservation or industrialization procedures which could eliminate the agent without affecting the toxic metabolite are used. On the other hand, mycotoxins may not be present in cereals which are visibly contaminated by fungi, since not all of the strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* are mycotoxin producers (Purchio, A. et al, International Symposium on Mycotoxin and Phycotox-

ins, S. Viena 1982, p. 105-10 and Castrillón, A.L. Doctor Thesis, 1984, 147p. Institute of Biomedical Science, São Paulo University) or the ideal environmental conditions temperature, moisture, etc. for the production of those toxic metabolites may not be present. In relation to the limiting factors over Aflatoxin production, it is known that certain elements such as iron, zinc, manganese and cadmium are absolutely necessary for the synthesis of aflatoxin in contraposition to the presence of barium, which inhibits it (Surayarayana, R.A.O., K. & Tulpule, P.G., *Nature* 214, 738-9, 1967). Some compounds, such as ethanol at 2% and thiamine (Bassapa, S.C. et al. *J.Exp. Biol.*, 5: 262-3, 1967) stimulate the production of these toxins while others increase its toxigenicity, as in the case of sele-

* Universidade de São Paulo – Instituto de Ciências Biomédicas - Departamento de Microbiologia – Seção de Micologia
Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 – CEP 05508 - São Paulo
São Paulo – Brazil.

nium in concentrations higher than 4ppm. (M.E. Coates, Personal Communication, coates, M.E.). The influence of the laboratory animals' diet on experimental results (Lab. animal studies in the quest to health and knowledge, Nov. 18-21, 1986) should be taken into consideration. The administration of contaminated ration for poultry has been one of the most important factors in what to economical damages and animal health lately. The mycotoxicoses are frequently detected in animals, since their rations are commonly made of grains which were rejected for human consume due to the presence of mites.

As a consequence of the increased importance of human and animal food's contamination problem, experimental researchs appeared in order to perform the inactivation of mycotoxin in the these materials (Dollear, F.G. et al, Fourth National Perarnut Research Conferences, Tifton, G.a., July 14-14, 1986 and Ciegler, A. et al. *App. Microbiol.*, 14: 934-9, 1966 and also to inhibit their production and for this chemical or microbiological methods were used.

Preservation is without doubt the best method to control the occurrence of mycotoxin in food, but in spite of all efforts, some times contamination in unavoidable.

Of all compounds studied, ammonia was the one which showed the most promising results, even when used in its anidra form or in the hydroxide form (Dollear, F.G. et al, Fourth National Perarnut Research Conference, Tifton, G.a., July 14-15, 1966). Nevertheless, in some cases the ammonia procedure is insatisfactory due to its high cost, toxigenicity and also to the changes on its organo characteristics.

In the microbiological method, the *Flavobacterium auratiacum* bacteria removed aflatoxin from solutions (Ciegler, A. et al. *App. Microbiol.*, 14: 934-9, 1966). As exposed, there is a considerable interest in discovering substances which might be employed on a larger scale for the prevention or elimination of contamination by aflatoxin producers or as an alternative, compounds which act as blockers of the synthesis of this mycotoxin. Until now, besides ammonia there is no known compound which fits the basic requirements with low cost of extraction and no toxigenicity. Based on this premise, Salomão, R.C. et al. *Rev. Microbiol.*, 13: 394-401, 1982, after studying several parts of medicinal plants, observed that the filtrate juice of *Agave sisalana's* leaf contains compound with a strong inhibiting effect over the growth of *A. flavus* and *A. parasiticus* and, in sub-inhibitory dos-

es, over the production of aflatoxins.

Following this line of research, the present study was conducted in order to verify the protecting effect in "in natura" corn grains samples, of *Agave sisalana's* leaf contaminated with toxigenic fungi (*A. flavus* and *A. parasiticus*).

The corn samples were obtained in local markets, in the form of grains and tests for the detection and isolation of toxigenic fungi and aflatoxins were performed. For the isolation of toxigenic fungi, 1g of milled corn was homogenized with 10ml of sterile saline for 10 minutes and the mixture left was quiet for 30 minutes. 0.1ml of the suspension were transferred to the surface of Petri plates containing Sabouraud-dextrose agar 100µg/ml of Chloranfenicol. The plates were observed after incubation at 25°C for 7 days. The analytical scheme for the detection of aflatoxin B 1 and G 1 followed the National Monitoring Program and Mycotoxin Control regulation (PCM - Mycotoxines), São Paulo, based in the Jones, B.D. - *Methods of aflatoxins analysis*. London, Tropical Products Institute, 1972, 58p.

After these tests, the samples were kept in closed envelopes of manila paper with 10g of corn each and sterilized in ethilene oxide autoclave (Carbetil-ethylene oxide 30% and CO₂, 70%).

Three strains of *A. flavus* (ICB-137, NRRL-3517 and NRRL 3357), three of *A. parasiticus* (ICB 136, NRRL 3145 and NRRL 2999) and three of *Aspergillus* sp (7c, MT 106 and MT 125) isolated in the Mycology Section of ICB-USP were used. These strains were tested in order to check their toxigenicity according to the norms of the national monitoring program and control (PCM-Mycotoxin).

The *A. sisalana* juice was obtained by pressing the plant's leaf, which resulted in about 500ml of suspension. This suspension was of a dark green color, having an acrid smell and a pH around 4.5. After it was left quiet for 15 hours, two different phases were obtained; one with higher density which revealed a mud - like sediment and which was discharged, and another, the supernatant, which was preserved for study. At the moment of its use, the juice was filtered in cotton and rept under refrigeration in order to avoid intense fermentation which normally occurs and consequently degradates the compounds present.

In order to investigate if the *Agave sisalana's* leaf juice had a fungic or fungistatic effect, the inoculum of test tubes in which there was no growth were transferred to test tubes containing Sabouraud-dextrose agar with 100µg/ml of chloranfeni-

col and incubated at 25°C for seven days. Had there been growth in the test tubes, the compound did have just a fungistatic effect; otherwise it did have a fungicide effect, (Salomão, R.C. et al, *Rev. Microbiol.*, 13: 394-401, 1982).

The sterile corn samples were transferred to sterile Erlenmeyer flasks, maintained under refrigeration for three and later contaminated with spores suspension from test tubes graded three in the MacFarland scale of the samples.

For each tested fungus added filtrated juice of the *Agave sisalana's* leaf, a control with damped corn and the suspension of the same fungus was used. All tests were performed in duplicates.

After seven days of incubation at 25°C, the flasks were observed for the presence or not of growth. If it was negative, the inoculum was taken away, according to what was described in the previous item. Afterwards it was reincubated for ten days more when aflatoxin could be detected.

The corn samples used in our study were not for sure contaminated by toxigenic fungi or by aflatoxin. The same samples treated with the filtrated juice of *Agave sisalana* were not colonized by the toxigenic fungi being studied, which was the opposite of what happened with the control.

The fact that this finding were confirmed for all strains of *A. flavus*, *A. parasiticus* and *Aspergillus* sp researched so that the studied juice had a fungicide activity over all samples, was remarkable. Due to this proprierty, there was no production of aflatoxin under these conditions.

Corn was the substrate chosen for the experiment since it contains a region sensitive for the settlement of fungic spores. Furthermore, like it happens with peanut, it is a substrate favorable to the production of aflatoxin.

The activity of the filtrated juice of *A. sisalana's* leaf was first observed in studies performed by Salomão, R. C. et al. *Rev. Microbiol.*, 13: 394-401, 1982.

Some of the biological properties of parts of the *Agave sisalana* plant have been known for a long time. Pio Correa, M. Dicionário de plantas úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, v. 1, p. 34-6, 1926, observed that the juice of some species of *Agave* had an insecticide activity, and that this plant's root has antisyphyllitic activities.

Simons, J.N. et al. *Phytopathology*, 53: 677-83, 1963, found anti-virus components in the juice of *Agave sisalana's* leaf, which can be separated in a celulose ionic exchange, column but this fraction has not been identified until present.

The activities of filtrated juice *A. sisalana's* leaf over toxigenic *Aspergillus* can be either fungicide or fungistatic depending on the samples, but always exhibiting an inhibitory activity over this fungic growth.

In relation to the activity of the filtrated juice of *Agave sisalana's* leaf over the production of aflatoxins, Salomão, R.C. et al. *Rev. Microbiol.*, 13: 394-401, 1982 observed that in sub-inhibitory doses the filtrated juice did not enable the production of mycotoxin by the *A. parasiticus* strain (ICB-136). The same fact was not observed in relation to *A. flavus* (ICB-137) as there was a production of 77% of B₁ aflatoxin in relation to the controls.

The isolated extracts of the corn cultures initially protected by the filtrated juice and then contaminated with the fungus showed that *A. parasiticus* NRRL-2999 and *A. Flavus* NRRL-3517 had the respective aflatoxin degraded by the filtrated juice of *Agave sisalana* in relation to the control. The bi-dimensional chromatography of these extracts showed fluorescent spots whose RF differed of those presented by the standard.

The aflatoxin molecule can be degraded by six different ways in liver Patterson, D.S. et al. *Rev. Vet. Sci.*, 11: 399, 1970). 'In vitro', a possible pathway is based on the fact that the aflatoxins B₁ and G₁ contain a double bond which is quickly attacked by oxidant and reducing agents. The mechanism by which the compounds present in the *Agave sisalana leaf's* filtrated juice have activity by degrading or inhibiting the action of aflatoxin in cultures of *A. flavus* and *A. parasiticus* is not known.

In studies performed by Keide Uyikawa, (personal communication), it was verified that some of this isolated compounds belong to the group of glycosides having as a base hecogeni.

Lajolo, F.M. *Rev. Fac. Farm. Bioquim. Univ. de São Paulo*, 5:373-81, 1967, analyzing some components of the mineral fraction of *Agave sisalana leaf's* juice, obtained iron (116, 8mg/100g) and manganese (126.3mg/100g), compounds which are essential for aflatoxin's synthesis, and also much calcium (1.35mg/100g), besides phosphorus (260.7ml/100g), sodium (51.5mg/100g) and potassium (109.8mg/100g).

According to Dollear, F.G. et al. Fourth National Perarnut Research Conference Tifton, G.a. July, 14-15, 1966, the calcium hydroxide is a moderately efficient compound in what refers to the degradation of the aflatoxin.

We believe that the use of the filtrated juice as a protector of corn is an effective measure against aflatoxin. This probably happens because the juice

may have mentioned besides the its particular acidity (pH 4.5), compounds with synergistic effect upon the degradation or inhibition of aflatoxin. On the other hand, the presence of the filtrated juice in corn results in darkening due to its greenish color and, being extremely acid, it provokes "burnings" in the film which protects the corn. Though, these aspects do not make the idea of using the filtrated juice of *Agave sisalana's* leaf for this purpose infeasible, since the ration is a mixture of milled grains and its darkening would not provoke its rejection by the animals but for a smell idiosyncrasy.

RESUMO

Utilização do suco filtrado da folha de *Agave sisalana* para inibição do crescimento de fungos toxigênicos.

Conforme observado por Salomão e Purchio, 1982, o suco filtrado da folha de *Agave sisalana* apresenta substância inibitória do crescimento de

Aspergillus flavus e *Aspergillus parasiticus* e em doses subnibitórias interfere na síntese de aflatoxinas. Seguindo esta linha de pesquisa, verificou-se esta atividade inibitória em amostras de milho contaminadas pelos fungos toxigênicos citados. Realizou-se testes demonstrando a eficiência dessa atividade em 3 amostras de *A. parasiticus*, 3 de *A. flavus* e 3 de *Aspergillus* sp. Esterilizou-se as amostras de milho por óxido de etileno sendo posteriormente colocadas em Erlenmeyer. As amostras foram umidecidas com suco e contaminadas por fungos toxigênicos. Evidenciou-se inibição de crescimento nos experimentos realizados, demonstrando-se, assim, a possibilidade do emprego do suco filtrado de *A. sisalana* para tal finalidade. Foram realizadas avaliações toxicológicas do suco para animais de laboratório.

Palavras-chave: *Agave sisalana*, suco das folhas, biossíntese de aflatoxina.

Received for publication in 23/11/90.



